

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP 00/6802

REC'D 13 OCT 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年10月 1日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第282188号

出願人
Applicant (s):

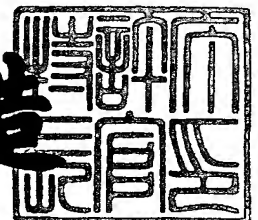
中外製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 8月25日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3067118

【書類名】 特許願

【整理番号】 994126

【提出日】 平成11年10月 1日

【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿

【国際特許分類】 A61K 39/395

【発明の名称】 静脈血栓症予防又は治療剤

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会
社内

【氏名】 北沢 剛久

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会
社内

【氏名】 吉橋 一隆

【特許出願人】

【識別番号】 000003311

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100077517

【弁理士】

【氏名又は名称】 石田 敬

【電話番号】 03-5470-1900

【選任した代理人】

【識別番号】 100092624

【弁理士】

【氏名又は名称】 鶴田 準一

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871

【弁理士】

【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【選任した代理人】

【識別番号】 100081330

【弁理士】

【氏名又は名称】 樋口 外治

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9814920

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 静脈血栓症予防又は治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト組織因子（ヒト T F）に対する抗体を含んで成る、静脈血栓症予防又は治療剤。

【請求項 2】 前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 1 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 3】 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 4】 前記抗体が組換え型抗体である、請求項 1 又は 3 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 5】 前記抗体が改変抗体である、請求項 1 又は 4 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 6】 前記改変抗体がキメラ抗体又はヒト型化抗体である、請求項 1, 4 又は 5 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 7】 前記ヒト型化抗体が、バージョン b - b, i - b、又は i - b 2 のヒト型化抗体である、請求項 6 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 8】 前記抗体が抗体修飾物である、請求項 1 又は 4 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の予防又は治療剤。

【請求項 9】 前記抗体修飾物が、抗体断片 F a b, F (a b ')₂ もしくは F v、又はシングルチェーン F v (s c F v) である、請求項 8 に記載の予防又は治療剤。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は静脈血栓症予防又は治療剤に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来技術】

静脈血栓が発症する機序として、静脈血流の遅滞、静脈壁の損傷および血液凝

固能の亢進が重要と考えられている。特に、手術や分娩、外傷などの侵襲は血管壁への物理的損傷や凝固線溶系の異常を招き、術後の臥床は静脈血流の遅滞をもたらす。その結果生じた静脈血栓は四肢の循環不全を来すのみならず、血栓そのものが血流に乗って肺動脈に流入することで致死的な肺塞栓症を来すため、静脈血栓症そのものの予防が重要とされている。そこで、静脈血栓を有効に予防又は治療できる医薬の開発が望まれている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

従って本発明は、静脈血栓症の新規な予防又は治療剤を提供しようとするものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】

上記の課題を解決すべく種々検討した結果、本発明者らは、ヒト組織因子に対する抗体（抗ヒトTF抗体、又は抗TF抗体と称する場合がある）により、静脈血栓症を予防又は治療することができることを見出した。

従って本発明は、抗ヒトTF抗体を含んで成る、静脈血栓症の予防又は治療剤を提供する。

【0005】

上記の抗ヒトTF抗体はポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体又は改変抗体もしくは抗体修飾物であることができる。モノクローナル抗体は一般にハイブリドーマにより生産されるが遺伝子組換えにより製造することもでき、また改変抗体及び抗体修飾物は、通常、遺伝子組換えにより製造される。改変抗体としては、キメラ抗体、例えばヒト-マウスキメラ抗体が例示され、ヒト型化抗体としては、例えば後で具体的に説明するバージョンb-b, i-b、及びi-b₂が挙げられる。抗体修飾物としては、Fab, F(ab')₂, Fvなどの抗体断片、及び抗体の可変領域を連結して1本鎖にしたシングルチェーンFv (scFvと称する)が挙げられる。

【0006】

【発明の実施の形態】

本発明において使用する抗体としては、ヒトTFに基く血液凝固亢進状態の持続を阻止することができる抗体であればポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれでもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。また、モノクローナル抗体に基くキメラ抗体、ヒト型化抗体、シングルチェーンFvなどを使用することもできる。ヒト型化抗体が特に好ましい。

【0007】

1. 抗ヒトTF抗体

本発明で使用される抗ヒトTF抗体は、静脈血栓症の予防又は治療効果を有するものであれば、その由来、種類（モノクローナル、ポリクローナル）および形状を問わない。

【0008】

本発明で使用される抗ヒトTF抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗ヒトTF抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものを含む。この抗体はヒトTFと結合することにより、静脈血栓症に対する予防又は治療効果を有する抗体である。

【0009】

2. 抗体産生ハイブリドーマ

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、ヒトTF又はその一部分（断片）を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0010】

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

まず、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトTFを、J.H.Morrissey ら、

Cell, Vol.50, p.129-135 (1987)に開示されたヒトTF遺伝子／アミノ酸配列を発現することによって得る。すなわち、ヒトTFをコードする遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のヒトTFタンパク質を公知の方法で精製する。この方法を、本明細書の参考例1に記載する。さらに、抗原として使用するヒトTFは参考例2に記載する方法によりヒト胎盤などのTF含有生物材料から抽出、精製して使用することもできる。

【0011】

次に、この精製ヒトTFタンパク質を感作抗原として用いる。あるいは、ヒトTFのC-末端側の膜貫通領域を除去した可溶性TFを例えば遺伝子組換えにより作製することもでき、これを感作抗原として使用することもできる。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が使用される。

【0012】

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。

このように哺乳動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

【0013】

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8.6

53)(Kearney, J.F. et al., J.Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3x63Ag8U.1 (Yelton, D.E. et al., Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler.G. and Milstein, C.Eur.J.Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies.D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270), F0 (de St.Groth, S.F. and Scheidegger, D.J., J.Immunol.Methods (1980) 35, 1-21), S194 (Trowbridge, I.S.J.Exp.Med. (1978) 148, 313-323), R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が好適に使用される。

【 0 0 1 4 】

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Galfre.G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46)等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (P E G)、センダイウィルス (H V J) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

【 0 0 1 5 】

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を 1 - 1 0 倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適な R P M I 1 6 4 0 培養液、M E M 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (F C S) 等の血清補液を併用することもできる。

【 0 0 1 6 】

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め 3 7 ° C 程度に加温した P E G 溶液 (例えば平均分子量 1 0 0 0 - 6 0 0 0 程度) を通常 3 0 - 6 0 % (w / v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) を形成する。続いて、適当な培養液

を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。

【0017】

このようにして得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。上記HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、数日～数週間）継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングを行う。

【0018】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を *in vitro* でヒトTFに感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞と融合させ、ヒトTFへの結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる。（特公平1-59878号公報参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てまたは一部のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるヒトTFを投与して抗ヒトTF抗体産生細胞を取得し、これを不死化させた細胞からヒトTFに対するヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号WO 94/25585号公報、WO 93/12227号公報、WO 92/03918号公報、WO 94/02602号公報参照）。

【0019】

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

【0020】

モノクローナル抗体の製造の例を参考例2に具体的に記載する。この例においては、ATR-2, 3, 4, 5, 7及び8と称する6種類のモノクローナル抗体を得ており、いずれも本発明において使用することができるが、ATR-5が特に好ましい。

【0021】

3. 組換え型抗体

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型のものを用いることができる（例えば、Vandamme, A.M. et al., Eur.J.Biochem. (1990) 192, 767-775, 参照）。

【0022】

具体的には、抗ヒトTF抗体を産生するハイブリドーマから、抗ヒトTF抗体の可変（V）領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J.M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299）、AGPC法（Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal.Biochem. (1987) 162, 156-159）等により行って全RNAを調製し、mRNA Purification Kit（Pharmacia製）等を使用して目的のmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit（Pharmacia製）を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

【0023】

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit（生化学工業社製）等を用いて行う。また、cDNAの合成および増幅を行うには、5'-Ampli FINDER RACE Kit（Clontech製）およびPCRを用いた5'-RACE法（Frohman, M.A. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA (1988) 85, 8998-9002, Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932）等を使用することができる。

【0024】

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連

結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。そして、目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法等により確認する。

目的とする抗ヒトTF抗体のV領域をコードするDNAを得たのち、これを、所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAを含有する発現ベクターへ組み込む。

【0025】

本発明で使用される抗ヒトTF抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより、宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。

抗体遺伝子の発現は、抗体重鎖（H鎖）または軽鎖（L鎖）をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換させてもよい（WO 94/11523号公報参照）。

【0026】

また、組換え型抗体の産生には上記宿主細胞だけではなく、トランスジェニック動物を使用することができる。例えば、抗体遺伝子を、乳汁中に固有に産生される蛋白質（ヤギβカゼインなど）をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。また、トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい（Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702）。

組換え抗体の製造方法の一例を参考例3に具体的に記載する。

【0027】

4. 改変抗体

本発明では、上記抗体のほかに、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト型化 (Humanized) 抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

【0028】

ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、これは、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている (欧州特許出願公開番号 EP 125023 号公報、WO 96/02576 号公報参照)。

【0029】

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region; FR) とを連結するように設計したDNA配列を、CDR及びFR両方の末端領域にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR法により合成する (WO 98/13388 号公報に記載の方法を参照)。

【0030】

CDRを介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

キメラ抗体及びヒト型化抗体のC領域には、ヒト抗体のものが使用され、例えばH鎖では、C γ 1, C γ 2, C γ 3, C γ 4を、L鎖ではC κ , C λ を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗

体C領域を修飾してもよい。

【0031】

キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来の定常領域とからなる。一方、ヒト型化抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC領域とからなる。ヒト型化抗体はヒト体内における抗原性が低下されているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

キメラ抗体の作製方法は参考例4に具体的に記載する。

また、ヒト型化抗体の作製方法を参考例5に具体的に記載する。この参考例においては、ヒト型化重鎖（H鎖）可変領域（V領域）として、表1及び表2に示すアミノ酸配列を有するバージョンa, b, c, d, e, f, g, h, i, j, b1, d1, b3及びd3を用いた。

【0032】

【表 1】

表 1

H鎖V領域のアミノ酸配列

	FR1	2	3	CDR1	4	FR2	5	6	CDR2
L39130(a)	123456789012345678901234567890	1234567890	12345	67890123456789	012A3456789012345				
Z34963(b)	QVQLLESGAVLARPGTSVKISCKASGPNIK	DYYMH	WVKRPGGLEWIG	GNDPANCHSMYDPKPPQG					
M30885(c)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M62723(d)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Z80844(e)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
L04345(f)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S78322(g)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Z26827(h)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
U95239(i)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
L03147(j)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P01742(b1)	-----	-----	-----	-----	R-A	M	-----	-----	-----
P01742(d1)	-----	-----	-----	-----	R-A	M	-----	-----	-----
Z80844(b3)	-----	-----	-----	-----	R-A	-----	-----	-----	-----
Z80844(d3)	-----	-----	-----	-----	R-A	-----	-----	-----	-----

【0 0 3 3】

【表 2】

表 2

H鎖V領域のアミノ酸配列（表1の続き）

	FR3			CDR3	FR4
	7	8	9	10	11
L39130(a)	67890123456789012ABC345678901234	5678901234	5678901234	56789012	34567890123
Z34963(b)	RAKLTAATSASIAYLEPSSLTNEDSAVYYCAR	DSGYAMDY	WGQGT	LVTVSS	
M30885(c)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I--				
M62723(d)	-VTMLVD--KNQFS-RL--V-AA-T--				
Z80844(e)	-VTI--DE-T-T--M-L--RS--F--				
L04345(f)	-VSI--DE-TK--M-LN--RS--T--F--				
S78322(g)	-VTI--DT-T-T--M-LR--RSD-T--				
Z26827(h)	K-T--DE-S-T--MQL--RS--S--				
U95239(i)	-VTMS-DK-S-A--QWT--KAS-T-I-P--				
L03147(j)	-VTI--D--T-TVFM-L--RS--T--				
P01742(b1)	-VTR--D--NT--M-LR--RSA-T--				
P01742(d1)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I--				
Z80844(b3)	-VTI--DE-T-T--M-L--RS--F--				
Z80844(d3)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I--				
	-VTI--DE-T-T--M-L--RS--F--				

また、ヒト型化軽鎖（L鎖）V領域として、表3に示すアミノ酸配列を有するバージョン a, b, c, b1 及び b2 を用いた。

【0034】

【表 3】

表 3

L鎖V領域のアミノ酸配列

	FR1		CDR1	FR2	CDR2
	1	2	3	4	5
	12345678901234567890123		45678901234	567890123456789	0123456
Z37332(a)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC		KASQDIKSFLS	WYQQKPGKAPKLLIY	YATSLAD
S68699(b)	-----		-----	-----	-----
P01607(c)	-----		-----	-----	-----
S65921(b1)	-----		-----	-F-----S--T---	-----
X93625(b2)	-----		-----	-----E--S---	-----

	FR3			CDR3	FR4
	6	7	8	9	10
	78901234567890123456789012345678			901234567	8901234567
Z37332(a)	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC			LQHGESPYT	FGGGTKVEIK
S68699(b)	-----Y-----			-----	-----
P01607(c)	-----Y-----I-----			-----	-----
S65921(b1)	-----Y-----			-----	-----
X93625(b2)	-----Y-----			-----	-----

そして、上記のH鎖V領域の種々のバージョンと、L鎖V領域の種々のバージョンを組合わせて抗原結合能、及びTF中和活性について評価した結果、参考例6及び参考例7に記載する通り、「H鎖V領域バージョン」-「L鎖V領域バージョン」として表示する場合「b-b」、「i-b」、及び「i-b2」が特に高活性を示した。なお、これらのヒト型化抗体の抗原結合能を図1に示し、ヒトTF中和活性（TFのファクターXa産生阻害活性）を図2に示し、ヒトTF中和活性（ファクターX結合阻害活性）を図3に示し、そしてヒトTF中和活性（

T F の血漿凝固阻害活性) を図 4 に示す。

【0035】

5. 抗体修飾物

本発明で使用される抗体は、ヒト T F に結合し、ヒト T F の活性を阻害するかぎり、抗体の断片又はその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、 $F a b$ 、 $F (a b')_2$ 、 $F v$ 、または H 鎖若しくは L 鎖の $F v$ を適当なリンカーで連結させたシングルチェーン $F v$ ($s c F v$) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えばパパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これらの抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる (例えば、Co, M.S. et al., J.Immunol. (1994) 152, 2968-2976, Better, M. & Horwitz, A.H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 497-515, Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1986) 121, 652-663, Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1986) 121, 663-669, Bird, R.E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 参照)。

【0036】

$s c F v$ は、抗体の H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域とを連結することにより得られる。この $s c F v$ において、H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域は、リンカー、好ましくはペプチドリンカーを介して連結される (Huston, J.S. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)。 $s c F v$ における H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域は、本明細書に抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V 領域を連結するペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸 12-19 残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

【0037】

$s c F v$ をコードする DNA は、前記抗体の H 鎖または H 鎖 V 領域をコードする DNA、および L 鎖または L 鎖 V 領域をコードする DNA のうち、それらの配列のうちの全部又は所望のアミノ酸配列をコードする DNA 部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いて PCR 法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードする DNA、およびその両端が各々 H 鎖、L 鎖と

連結されるように規定するプライマー対を組み合わせることで増幅することにより得られる。

【0038】

また、一旦 s c F v をコードする DNA が作製されると、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従って s c F v を得ることができる。

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

【0039】

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗ヒト T F 抗体を使用することもできる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。

【0040】

6. 組換え型抗体または改変抗体の発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現させる抗体遺伝子、その 3' 側下流にポリ A シグナルを機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

【0041】

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス 40 (SV40) 等のウイルスプロモーター／エンハンサー、あるいはヒトエロンゲーションファクター 1 α (HEF1 α) などの哺乳類細胞由来

のプロモーター／エンハンサー等が挙げられる。

SV40プロモーター／エンハンサーを使用する場合はMulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108-114) により、また、HEF1 α プロモーター／エンハンサーを使用する場合はMizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) により、容易に遺伝子発現を行うことができる。

【0042】

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列及び発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて当該遺伝子を発現させることができる。プロモーターとしては、例えばlacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合はWardらの方法 (Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) により、あるいはaraBプロモーターを使用する場合はBetterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043)により発現することができる。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S.P. et al J.Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383) を使用すればよい。そして、ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切に組み直して (refold) 使用する。

【0043】

複製起源としては、SV40、ポリオマウイルス、アデノウイルス、ウシバビロマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは、選択マーカーとしてアミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Eco gpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

【0044】

本発明で使用する抗体の製造のために、任意の発現系、例えば真核細胞又は原核細胞系を使用することができる。真核細胞としては、例えば樹立された哺乳類細胞系、昆虫細胞系、真糸状菌細胞および酵母細胞などの真核細胞等が挙げら

れ、原核細胞としては、例えば大腸菌細胞等の細菌細胞が挙げられる。

好ましくは、本発明で使用される抗体は、哺乳類細胞、例えばCHO、COS、ミエローマ、BHK, Vero, HeLa細胞中で発現される。

次に、形質転換された宿主細胞をin vitroまたはin vivoで培養して目的とする抗体を産生させる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM, MEM, RPMI 1640, IMDMを使用することができ、牛胎児血清(FCS)等の血清補液を併用することもできる。

【0045】

7. 抗体の分離、精製

前記のように発現、産生された抗体は、細胞、宿主動物から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティーカラムを用いて行うことができる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F.F. (Pharmacia 製) 等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティーカラム以外のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

【0046】

8. 静脈血栓の予防・治療効果の確認

本発明の抗ヒトTF抗体が静脈血栓の予防・治療効果を有することを、実施例1において具体的に記載する。

【0047】

9. 投与方法および製剤

本発明の治療剤は、血液凝固亢進状態が持続する疾患の、予防、治療又は改善を目的として使用される。

有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.001mgから1000mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり0.01~100mg/kg、好ましくは0.1

～10mg/kgの投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の抗ヒトTF抗体を含有する治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

【0048】

投与方法は特に限定されないが、静脈注射、点滴静脈注射等が好ましい。

本発明の抗ヒトTF抗体を有効成分として含有する治療剤は、常法にしたがって製剤化することができ (Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, 米国)、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

【0049】

このような担体および医薬添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアシルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン (HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

【0050】

実際の添加物は、本発明治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせて選ばれるが、もちろんこれらに限定するものではない。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された抗ヒトTF抗体を溶剤、例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等に溶解し、これに吸着防止剤、例えばTween 80, Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解再構成する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよく、凍結乾燥のための賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

【0051】

【実施例】

次に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例 1.

静脈血流の鬱滞と静脈壁の傷害で誘発した静脈血栓モデルを用いて、静脈血栓症に対するヒト型化抗ヒトTF抗体の効果を評価した。静脈血流の鬱滞は血管の結紮により作製した。静脈壁の傷害は、「ポリドカノール（食道静脈瘤治療薬、クロイスラー社）」を用いて惹起した。

【0052】

推定年齢 3～4 歳、体重2.97～3.99kgの雄のカニクイザル（広西霊長類実験動物研究センター、中華人民共和国より入手）を用いた。カニクイザルをイソフルラン及び笑気で麻酔し、左右内頸静脈を露出させた。血管露出部の心臓側を完全に結紮した。血管露出部の頭部側は可逆的に結紮した。両結紮部の間の血管に心臓側からカテーテルを挿入した。血管内の血液を除去し、内部を生理食塩水で洗浄した。血管内にカテーテルより0.5 % ポリドカノールを注入した。カテーテルを除去すると同時に、カテーテル挿入部位の直上流部を可逆的に結紮した。

【0053】

5 分後、心臓側の可逆的結紮部位を解除し、ポリドカノールを除いた。頭部側の可逆的結紮部位を解除し、少量の血液を流した後、心臓側の可逆的結紮部位を結紮した。血管内に血液が満たされた後、頭部側の可逆的結紮部位を結紮した。血栓作製部位の長さは1.5 cmになるように調整した。30分後、形成された血栓湿重量を測定した。評価には左右内頸静脈内の血栓湿重量の合計を用いた。ヒト型化抗ヒトTF抗体バージョン「i-b 2」は0.3 mg/kg 及び1.5 mg/kg の用量で、静脈血栓形成開始の2 時間前に静脈内投与した。

結果を下表に示した。ヒト型化抗ヒトTF抗体の投与により形成される血栓重量は減少した。従って、ヒト型化抗ヒトTF抗体が静脈血栓形成の予防効果を有することが明らかになった。

【0054】

【表 4】

表 4

カニクイザル静脈血栓モデルにおけるヒト型化抗ヒトTF抗体の効果

		被検薬無投与 (n=2)	ヒト型化 抗ヒトTF抗体 0.3mg/kg i.v. (n=2)	ヒト型化 抗ヒトTF抗体 1.5mg/kg i.v. (n=2)
静脈血栓湿重量 左右内頸静脈 合計 (mg)		20.8	1.4	0.0
		21.9	1.1	0.4
	平均	21.4	1.3	0.2

【0055】

参考例 1. 可溶型ヒトTFの作製法

可溶型ヒトTF (shTF) は以下のように作製した。

ヒトTFの貫通領域(220番目のアミノ酸)以下をFLAGペプチドM2に置換したものをコードする遺伝子を、哺乳動物細胞用の発現ベクター(ネオマイシン耐性遺伝子、DHFR遺伝子を含む)に挿入し、CHO細胞に導入した。ヒトTFのcDNA配列はJames H. Morrisseyらの報告(Cell(1987) 50, 129-135)を参考にした。この可溶型ヒトTFの遺伝子配列とアミノ酸配列を配列番号101及び102に示した。G418により薬剤セレクションし、発現細胞を選抜し、さらにメトトレキサートで発現増幅をかけ、shTF発現細胞を樹立した。

【0056】

この細胞を無血清培地CHO-S-SFMII(GIBCO)で培養し、shTFを含む培養上清を得た。同容量の40mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)で2倍に希釈し、20mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)で平衡化したQ-Sepharose Fast Flowカラム(100mL, Pharmacia Biotech)に添加し、0.1M NaClを含む同緩衝液で洗浄後、NaClの濃度を0.3Mとし、shTFをカラムから溶出した。得られたshTF画分に終濃度2.5Mとなるように硫酸

アンモニウムを加え、遠心操作 (10,000 rpm, 20分) により夾雑蛋白質を沈殿させた。上清をButyl TOYOPEARL (30 mL, TOSOH) に添加し、2.5 Mの硫酸アンモニウムを含む50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) で洗浄した。

【0057】

50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) 中、硫酸アンモニウム濃度を2.5 Mから0 Mまで直線的に下げ、shTFを溶出させた。shTFを含むピーク画分をCentri-Prep 10 (アミコン) で濃縮した。150 mM NaClを含む20 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したTSK gel G3000 SWGカラム (21.5 × 600 mm, TOSOH) に濃縮液を添加し、shTFのピーク画分を回収した。これを0.22 μmのメンブランフィルターで濾過滅菌し、可溶性ヒトTF (shTF) とした。試料の吸光度280 nmのモル吸光係数を $\epsilon = 40,130$ 、分子量を43,210として、試料の濃度を算出した。

【0058】

参考例 2. 抗TFモノクローナル抗体の作製

1. ヒトTFの精製

ヒト胎盤からのTFの精製は、Itoらの方法 (Ito, T.ら J. Biochem. 114, 691-696, 1993) に準じて行った。すなわち、ヒト胎盤を10 mM塩化ベンザミジン、1 mMフッ化フェニルメチルスルフォニル、1 mMジイソプロピルフルオロフォスフェートおよび0.02%アジ化ナトリウムを含むトリス緩衝生理食塩液 (TBS, pH 7.5) 中でホモジナイズ後、沈殿を冷アセトンで脱脂し、得られた脱脂粉末を2% Triton X-100を含む上記緩衝液に懸濁してTFを可溶化した。

【0059】

この上清からConcanavalin A-Sepharose 4Bカラム (Pharmacia) および抗TF抗体を結合させたSepharose 4Bカラム (Pharmacia) を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行い、精製TFを得た。これを限外濾過膜 (PM-10, Amicon) で濃縮し、精製標品として4℃で保存した。

精製標品中のTF含量は、市販の抗TFモノクローナル抗体 (American Diagnostica) とポリクローナル抗体 (American Diagnostica) を組合せた Sandwich ELISAで、組換え型TFを標準にして定量した。

また精製標品の純度は、4-20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGEしたものを銀染色することで確認した。

【0060】

2. 免疫とハイブリドーマの作製

精製ヒトTF (約 $70 \mu\text{g}/\text{ml}$) を等容量の Freund の完全アジュバント (Difco) と混合し、乳化した後、5週齢の Balb/c 系雄性マウス (日本チャールスリバー) の腹部皮下に、TFとして $10 \mu\text{g}/\text{mouse}$ となるように免疫した。初回免疫の12, 18及び25日後には Freund の不完全アジュバントと混合したTFを $5 \mu\text{g}/\text{mouse}$ となるように皮下に追加免疫し、最終免疫として32日目にPBSで希釈したTF溶液を $5 \mu\text{g}/\text{mouse}$ で腹腔内投与した。

【0061】

最終免疫の3日後に4匹のマウスから脾細胞を調製し、細胞数で約1/5のマウスミエローマ細胞株P3U1とポリエチレングリコール法を用いて融合させた。融合細胞を10%ウシ胎仔血清を含むRPMI-1640培地 (以下RPMI-1640培地とする) (Lifetech oriental) に懸濁し、96穴プレートに1匹のマウスにつき400穴播種した。融合後、1, 2, 3, 5日目に培地の半量をHAT (大日本製薬) およびcondimed H1 (Boehringer Mannheim GmbH) を含むRPMI-1640培地 (以下HAT-培地とする) に交換することで、ハイブリドーマのHAT選択を行った。

【0062】

下記のスクリーニング法で選択したハイブリドーマは2回の限界希釈を行うことでクローン化した。

限界希釈は、96穴プレート2枚に一穴あたり0.8個の細胞を播種した。検鏡により単一コロニーであることが確認できた穴について、下記に示したTF結合活性とTF中和活性の測定を行いクローンを選択した。得られたクローンはH

A T-培地から R P M I-培地に馴化し、馴化による抗体産生能の低下が無いことを確認したうえで、再度限界希釈を行い、完全なクローン化を行った。以上の操作により、T F /ファクター V I I a 複合体とファクター X との結合を強く阻害する抗体 6 種 (A T R-2, 3, 4, 5, 7 及び 8) を産生するハイブリドーマが樹立できた。

【0063】

3. 腹水の作製および抗体の精製

樹立したハイブリドーマの腹水の作製は常法に従って行った。すなわち、*in vitro*で継代したハイブリドーマ 10^6 個を、あらかじめ鉱物油を 2 回腹腔内に投与しておいた B a l b / c 系雄性マウスの腹腔内に移植した。移植後 1 ~ 2 週目で腹部が肥大したマウスから腹水を回収した。

腹水からの抗体の精製は、Protein A カラム (日本ガイシ) を装着した ConSe pLC100 システム (Millipore) を用いて行った。

【0064】

4. C e l l - E L I S A

T F を高発現することで知られているヒト膀胱癌由来細胞株 J 8 2 (Fair D.S. ら、J.Biol.Chem., 262, 11692-11698, 1987) を A T C C より導入し、R P M I-培地中、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 100% 湿度の条件で継代・維持した。

C e l l - E L I S A 用プレートは、96穴プレートに J 8 2 細胞を 10^5 個 / 穴の濃度で播種し、上記条件で 1 日培養後、培地を除いてリン酸緩衝生理食塩液 (P B S) で 2 回洗浄し、 4% パラホルムアルデヒド溶液 (P F A) を加えて氷冷下で 10 分静置することで固定化することによって作製した。P F A を除去し、P B S で洗浄後、 $1\% \text{BSA}$ および 0.02% アジ化ナトリウムを含む T r i s 緩衝液 (Blocking 緩衝液) を加えて、使用時まで 4°C で保存した。

【0065】

C e l l - E L I S A は以下のように行った。すなわち、上記のように作製したプレートから Blocking 緩衝液を除去し、抗 T F 抗体溶液もしくはハイブリドーマ培養上清を加えて室温で 1.5 時間反応させた。 $0.05\% \text{Tween 20}$ を含む P B S で洗浄後、アルカリフォスファターゼを結合したヤギ抗マウス I g

G (H+L) (Zymed) を 1 時間反応させ、洗浄後、1 mg/ml の p-ニトロフェニルホスフェート二ナトリウム (Sigma) を添加して 1 時間後に 405 nm における吸光度を測定することで、J82 細胞に結合した抗 TF 抗体量を定量した。

【0066】

5. ファクター Xa 活性を指標とした TF 中和活性測定系

50 μ l の 5 mM CaCl₂ および 0.1% ウシ血清アルブミンを含むトリス緩衝生理食塩液 (TBS: pH 7.6) に 10 μ l のヒト胎盤由来トロンボプラスチン溶液 (5 mg/ml) (Thromborel S) (Boehring) と 10 μ l のファクター VIIa 溶液 (82.5 ng/ml) (American Diagnostica) を添加し、室温で 1 時間反応させることで TF/Factor VIIa 複合体を形成させた後、10 μ l の所定濃度に希釈した抗 TF 抗体溶液もしくはハイブリドーマ培養上清および 10 μ l の Factor X 溶液 (3.245 μ g/ml) (Celsus Laboratorise) を添加して 45 分間反応させ、0.5 M EDTA を 10 μ l 添加することで反応を止めた。ここに 2 mM S-2222 溶液 (第一化学薬品) を 50 μ l 添加し、30 分間の 405 nm における吸光度変化をもって TF の Factor Xa 産生活性とした。この方法では、TF/Factor VIIa 複合体と Factor X との結合を阻害する抗体の活性は測定できる。

【0067】

6. 血漿凝固阻害活性測定系

市販の正常ヒト血漿 (コージンバイオ) を用い、この 100 μ l に適当に希釈した抗 TF 抗体溶液 50 μ l を混和して 37°C で 3 分間反応させた後、50 μ l のヒト胎盤由来トロンボプラスチン溶液 (1.25 mg/ml) を添加し、血漿が凝固するまでの時間を血漿凝固時間測定装置 (CR-A: Amelung) で測定した。

【0068】

7. 抗体のアイソタイプの決定

ハイブリドーマの培養上清もしくは精製抗体について、マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット (Amersham 社製) を用いて抗体のアイソタイプを確認し、結果を下に示した。

【0069】

【表 5】

表 5

抗TFモノクローナル抗体のイムノグロブリンアイソタイプ

ATR-2	IgG1, k
ATR-3	IgG1, k
ATR-4	IgG1, k
ATR-5	IgG1, k
ATR-7	IgG2a, k
ATR-8	IgG2a, k

【0070】

参考例 3. ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAのクローニング

(1) mRNAの調製

参考例2で得たハイブリドーマATR-5 (IgG1 κ) からmRNAをQuick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech) を用いて調製した。キット添付の処方に従い、それぞれのハイブリドーマ細胞を抽出緩衝液で完全にホモジナイズし、オリゴ(dT)-セルローススパンカラムにてmRNAを精製し、エタノール沈殿を行った。mRNA沈殿物を溶出緩衝液に溶解した。

【0071】

(2) マウス抗体V領域をコードする遺伝子のcDNAの作製及び増幅

(i) H鎖V領域cDNAのクローニング

ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'-RACE法(Frohman, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acid Res. 17, 2919-2932, 1989) により行った。5'-RACE法にはMarathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH) を用い、操作はキット添付の処方に従って行った。

【0072】

前記のようにして調製したmRNA約1 μgを鋳型として、キット添付のcDN

A synthesis primerを加え、逆転写酵素と42℃、60分間反応させることによりcDNAへの逆転写を行った。これをDNAポリメラーゼI、DNAリガーゼ、RNaseHで16℃、1.5時間、T4 DNAポリメラーゼで16℃、45分間反応させることにより、2本鎖cDNAを合成した。2本鎖cDNAをフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により回収した。

【0073】

T4 DNAリガーゼで16℃で一夜反応することにより、2本鎖cDNAの両端にcDNA アダプターを連結した。反応混合液は10mM Tricine-KOH (pH8.5)、0.1mM EDTA溶液で50倍に希釈した。これを鋳型としてPCRによりH鎖V領域をコードする遺伝子を増幅させた。5'-側プライマーにはキット添付のアダプタープライマー1を、3'-側プライマーにはMHC-G1プライマー (配列番号1)(S.T.Jones, et al., Biotechnology, 9, 88-89, 1991)を使用した。

【0074】

ATR-5抗体H鎖V領域に対するPCR溶液は、100μl中に120mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM KCl、6mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgCl₂、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ (東洋紡績)、30~50pmoleのアダプタープライマー1並びにMHC-G1プライマー、及びcDNAアダプターを連結したcDNAの反応混合物1~5μlを含有する。

PCRはいずれもDNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer)を用い、94℃にて30秒間、55℃にて30秒間、74℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

【0075】

(ii) L鎖V領域cDNAのクローニング

ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'-RACE法 (Frohman, M.A. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acid Res. 17, 2

919-2932, 1989) により行った。5' - R A C E 法には Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH) を使い、操作はキット添付の処方に従って行った。前記のようにして調製した mRNA 約 1 μ g を鋳型として cDNA 合成プライマーを加え、逆転写酵素と 42℃、60 分間反応させることにより cDNA への逆転写を行った。

【0076】

これを DNA ポリメラーゼ I、DNA リガーゼ、RNase H で 16℃、1.5 時間、T4 DNA ポリメラーゼで 16℃、45 分間反応させることにより、2 本鎖 cDNA を合成した。2 本鎖 cDNA をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により回収した。T4 DNA リガーゼで 16℃ で一夜反応することにより、2 本鎖 cDNA の両端に cDNA アダプターを連結した。反応混合液は 10 mM Tricine-KOH (pH 8.5)、0.1 mM EDTA 溶液で 50 倍に希釈した。これを鋳型として PCR により L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を増幅させた。5' - 側プライマーにはアダプタープライマー 1 を、3' - 側プライマーには MKC プライマー (配列番号 2) (S.T.Jones, et al., Biotechnology, 9, 88-89, 1991) を使用した。

【0077】

PCR 溶液は、100 μ l 中に 120 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM KCl、6 mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1 mM MgCl₂、2.5 ユニットの KOD DNA ポリメラーゼ (東洋紡績)、30~50 pmole のアダプタープライマー 1 並びに MKC プライマー、及び cDNA アダプターを連結した cDNA の反応混合物 1 μ l を含有する。

PCR は DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer) を使い、94℃ にて 30 秒間、55℃ にて 30 秒間、74℃ にて 1 分間の温度サイクルで 30 回行った。

【0078】

(3) PCR 生成物の精製及び断片化

前記の PCR 反応混合液をフェノール及びクロロホルムで抽出し、増幅した D

NA断片をエタノール沈殿により回収した。DNA断片を制限酵素Xma I (New England Biolabs) により37℃で1時間消化した。Xma I消化混合物を2%から3%のNuSieve GTG アガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、H鎖V領域として約500bp長、L鎖V領域として約500bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、10mM Tris-HCl (pH 8.0)、1mM EDTA溶液 (以下、TEと称す) 10μlに溶解した。

【0079】

上記のようにして調製したマウスH鎖V領域及びL鎖V領域をコードする遺伝子を含むXma I消化DNA断片と、Xma Iで消化することにより調製したpUC19プラスミドベクターとをDNAライゲーションキットver. 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100μlに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。

【0080】

次いで300μlのHi-Competence Broth (ニッポンジーン) を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100μg/ml アンピシリンを含むLB寒天培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) (以下、LBA寒天培地と称す) 上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

この形質転換体を50μg/ml アンピシリンを含有するLB培地 (以下、LBA培地と称す) 3mlあるいは4mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドDNAを調製し、塩基配列の決定を行った。

【0081】

(4) マウス抗体V領域をコードする遺伝子の塩基配列決定

前記のプラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 37

3A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M 4(宝酒造) (配列番号3) 及びM13 Primer RV(宝酒造) (配列番号4) を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

【0082】

こうして得られたハイブリドーマATR-5に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含むプラスミドをATR-5Hv/pUC19と命名し、そしてL鎖V領域をコードする遺伝子を含むプラスミドをATR-5Lv/pUC19と命名した。プラスミドATR-5Hv/pUC19に含まれる各マウス抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列(対応するアミノ酸配列を含む)をそれぞれ配列番号5及び99に、プラスミドATR-5Lv/pUC19に含まれる各マウス抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列(対応するアミノ酸配列を含む)をそれぞれ配列番号6及び100に示す。

【0083】

参考例4. キメラ抗体の構築

マウスATR-5抗体V領域をヒト抗体C領域に連結したキメラATR-5抗体を作製した。ATR-5抗体V領域をコードする遺伝子をヒト抗体C領域をコードする発現ベクターに連結することにより、キメラ抗体発現ベクターを構築した。

【0084】

(1) キメラ抗体H鎖V領域の構築

ヒト抗体H鎖C領域をコードする発現ベクターに連結するために、ATR-5抗体H鎖V領域をPCR法により修飾した。5'-側プライマーch5HS(配列番号7)はV領域をコードするDNAの5'-末端にハイブリダイズし、且つKozakコンセンサス配列(Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987) 及び制限酵素Sal Iの認識配列を有するように設計した。3'-側プライマーch5HA(配列番号8)はJ領域をコードするDNAの3'-末端にハイブリダイズし、且つ制限酵素Nhe Iの認識配列を有するように設計した。

【0085】

PCR溶液は、100 μ l中に120 mM Tris-HCl (pH 8.0)

、10mM KCl、6mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgCl_2 、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績)、50pmoleのch5HSプライマー並びにch5HAプライマー、及び鋳型DNAとして1 μ lのプラスミドATR5Hv/pUC19を含有する。PCRはDNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer)を用い、94℃にて30秒間、55℃にて30秒間、74℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

【0086】

PCR反応混合液をフェノール及びクロロホルムで抽出し、増幅したDNA断片をエタノール沈殿により回収した。DNA断片を制限酵素Nhe I (宝酒造)により37℃で1時間消化し、次いで制限酵素Sal I (宝酒造)により37℃で1時間消化した。この消化混合物を3% NuSieve GTGアガロース (FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約450bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TE20 μ lに溶解した。

【0087】

クローニングベクターには制限酵素Nhe I、Sal I及びSpl I、Bgl IIの認識配列を導入した改変pUC19ベクター(以下、CVIDECと称す)を用いた。上記のようにして調製したマウスH鎖V領域をコードする遺伝子断片とNhe I及びSal Iで消化することにより調製したCVIDECベクターをDNAライゲーションキットver. 2 (宝酒造)を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

【0088】

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞(ニッポンジーン)100 μ lに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300 μ lのHi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100 μ g/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃に

て一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地3mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドDNAを調製した。

【0089】

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4(宝酒造) 及びM13 Primer RV(宝酒造) を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。このATR-5抗体H鎖V領域をコードする遺伝子を含み、5' -側にSal I 認識配列及びKozakコンセンサス配列、3' -側にNhe I 認識配列を持つプラスミドをchATR5Hv/CVIDECと命名した。

【0090】

(2) キメラ抗体L鎖V領域の構築

ヒト抗体L鎖C領域をコードする発現ベクターに連結するために、ATR-5抗体L鎖V領域をPCR法により修飾した。5' -側プライマーch5LS(配列番号9) はV領域をコードするDNAの5' -末端にハイブリダイズし、且つKozakコンセンサス配列(Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987) 及び制限酵素Bgl IIの認識配列を有するように設計した。3' -側プライマーch5LA(配列番号10) はJ領域をコードするDNAの3' -末端にハイブリダイズし、且つ制限酵素Spl Iの認識配列を有するように設計した。

【0091】

PCR溶液は、100 μ l中に120mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM KCl、6mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgCl_2 、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績)、50 pmoleのch5LSプライマー並びにch5LAプライマー、及び鋳型DNAとして1 μ lのプラスミドATR5Lv/pUC19を含有する。PCRはDNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer)

を用い、94℃にて30秒間、55℃にて30秒間、74℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

【0092】

PCR反応混合液をフェノール及びクロロホルムで抽出し、増幅したDNA断片をエタノール沈殿により回収した。DNA断片を制限酵素S p l I（宝酒造）により37℃で1時間消化し、次いで制限酵素B g l II（宝酒造）により37℃で1時間消化した。この消化混合物を3% NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約400bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、20μlのTEに溶解した。

【0093】

上記のようにして調製したマウスL鎖V領域をコードする遺伝子断片とS p l I及びB g l IIで消化することにより調製したC V I D E CベクターをDNAライゲーションキットver. 2（宝酒造）を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞（ニッポンジーン）100μlに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300μlのHi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100μg/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地3mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを調製した。

【0094】

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer)により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4(宝酒造)及びM13 Primer RV(宝酒造)を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。このATR-5抗体L鎖V領域をコードする遺伝子を含有し

、5' 一侧に B g l II 認識配列及び K o z a k コンセンサス配列、3' 一侧に S p l I 認識配列を持つプラスミドを c h A T R 5 L v / C V I D E C と命名した。

【0095】

(3) キメラ抗体発現ベクターの構築

I D E C 社より導入した抗体発現ベクターを用いてキメラ抗体発現ベクターを構築した。ベクターには I g G 1 型抗体発現ベクター N 5 K G 1 (V) 及び I g G 4 型抗体発現ベクター N 5 K G 4 P を用いた。発現ベクター N 5 K G 1 (V) あるいは N 5 K G 4 P のヒト抗体 H 鎖 C 領域の直前にある S a l I - N h e I 部位に A T R - 5 の H 鎖 V 領域をコードする遺伝子を、ヒト抗体 L 鎖 C 領域の直前にある B g l II - S p l I 部位に A T R - 5 の L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を連結することによって、キメラ A T R - 5 抗体発現ベクターを作製した。

【0096】

(i) H 鎖 V 領域の導入

プラスミド c h A T R 5 H v / C V I D E C を制限酵素 N h e I (宝酒造) により 37℃ で 3 時間消化し、次いで制限酵素 S a l I (宝酒造) により 37℃ で 3 時間消化した。この消化混合物を 1.5% NuSieve GTG アガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約 450 b p 長の D N A 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、D N A 断片をエタノールで沈殿させた後、T E 20 μ l に溶解した。

【0097】

発現ベクター N 5 K G 1 (V) 及び N 5 K G 4 P を制限酵素 N h e I (宝酒造) により 37℃ で 3 時間消化し、次いで制限酵素 S a l I (宝酒造) により 37℃ で 3 時間消化した。この消化混合物を 1.5% NuSieve GTG アガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約 9000 b p 長の D N A 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、D N A 断片をエタノールで沈殿させた後、T E 60 μ l に溶解した。

【0098】

上記のようにして調製したH鎖V領域をコードする遺伝子を含むSalI-NheI DNA断片とSalI及びNheIで消化したN5KG1 (V)あるいはN5KG4PをDNAライゲーションキットver. 2 (宝酒造)を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

【0099】

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞(ニッポンジーン)100μlに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300μlのHi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100μg/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地3mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを調製した。これらキメラATR-5抗体H鎖をコードする遺伝子を含むプラスミドをそれぞれchATR5Hv/N5KG1 (V)、及びchATR5Hv/N5KG4Pと命名した。

【0100】

(ii) L鎖V領域の導入

プラスミドchATR5Lv/CVIDECを制限酵素BglII (宝酒造)及びSplI (宝酒造)により37℃で1.5時間消化した。この消化混合物を1.5% NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約400bp長のDNA断片を含むアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、20μlのTEに溶解した。

【0101】

プラスミドchATR5Hv/N5KG1 (V)及びchATR5Hv/N5KG4Pを制限酵素BglII (宝酒造)及びSplI (宝酒造)により37℃で1.5時間消化した。この消化混合物を1.5% NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約9400bp長のDNA断片を含むアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール

及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TE20 μ lに溶解した。

【0102】

上記のようにして調製したL鎖V領域をコードする遺伝子を含むS p l I - B g l II DNA断片とS p l I及びB g l IIで消化したc h A T R 5 H v / N 5 K G 1 (V)あるいはc h A T R 5 H v / N 5 K G 4 PをDNAライゲーションキットv e r. 2 (宝酒造)を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

【0103】

この連結混合物を大腸菌J M 1 0 9 コンピテント細胞(ニッポンジーン)100 μ lに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300 μ lのHi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100 μ g/ml L B A寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を50 μ g/ml アンピシリンを含有する2×Y T培地1 lで37℃にて一夜培養し、菌体画分からP l a s m i d M a x i K i t (Q I A G E N)を用いてプラスミドDNAを調製した。これらキメラA T R - 5抗体をコードする遺伝子を含有するプラスミドをそれぞれc h A T R 5 / N 5 K G 1 (V)、c h A T R 5 / N 5 K G 4 Pと命名した。

【0104】

(4) C O S - 7細胞へのトランスフェクション

キメラ抗体の抗原結合活性及び中和活性を評価するため、前記発現プラスミドをC O S - 7細胞にトランスフェクションし、キメラ抗体を一過性に発現させた。

プラスミドc h A T R 5 / N 5 K G 1 (V)あるいはc h A T R 5 / N 5 K G 4 PをG e n e P u l s e r装置(B i o R a d)を用いてエレクトロポレーションによりC O S - 7細胞に形質導入した。ダルベッコP B S (-) (以下、P B Sと称す)中に 1×10^7 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているC O S - 7細胞0.78 mlに、プラスミド50 μ gを加え、1,500 V, 25 μ F

の静電容量にてパルスを与えた。

【0105】

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を5%の Ultra Low IgGウシ胎児血清(GIBCO) を含有するDMEM培地(GIBCO) に懸濁し、10cm培養皿を用いてCO₂ インキュベーターにて培養した。24時間の培養の後、培養上清を吸引除去し、新たに無血清培地HBCHO（アーバインサイエンティフィック）を加えた。さらに72時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去した。

【0106】

(5) 抗体の精製

COS-7細胞の培養上清からキメラ抗体を、rProtein A Sepharose Fast Flow(Pharmacia Biotech) を用いて以下のように精製した。

1mlのrProtein A Sepharose Fast Flowをカラムに充填し、10倍量のTBSを流すことによってカラムを平衡化した。平衡化したカラムにCOS-7細胞の培養上清をアプライした後、10倍量のTBSによってカラムを洗浄した。

【0107】

次に、13.5mlの2.5mM HCl (pH3.0) を流すことによって吸着した抗体画分をカラムより溶出し、直ちに1.5mlの1M Tris-HCl (pH8.0) を加えることによって溶出液を中和した。

精製された抗体画分について、セントリプレップ100 (Amicon) を用いた限外濾過を2回行うことにより、150mM NaClを含む50mM Tris-HCl (pH7.6) (以下、TBSと称す) に溶媒を置換し、最終的に約1.5mlまで濃縮した。

【0108】

(6) CHO安定産生細胞株の樹立

キメラ抗体の安定産生細胞株を樹立するため、CHO-S-SFMII無血清培地(GIBCO) に馴化したCHO細胞(DG44) に前記発現プラスミドを導入した。

プラスミドchATR5/N5KG1 (V) あるいはchATR5/N5KG

4 P を制限酵素 S s p I (宝酒造) で切断して直鎖状 DNA にし、フェノール及びクロロホルムで抽出の後、エタノール沈殿で DNA を回収した。直鎖状にしたプラスミドを Gene P u l s e r 装置 (Bio Rad) を用いてエレクトロポレーションにより DG 4 4 細胞に形質導入した。PBS 中に 1×10^7 細胞/ml の細胞濃度で懸濁されている DG 4 4 細胞 0.78 ml に、プラスミド 10 μ g を加え、1,500 V, 25 μ F の静電容量にてパルスを与えた。

【0109】

室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞をヒポキサンチン・チミジン (G I B C O) を含有する CHO-S-SFMII 培地 (GIBCO) に懸濁し、2 枚の 96 穴プレート (F a l c o n) を用いて CO₂ インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、ヒポキサンチン・チミジン (GIBCO) 及び 500 μ g/ml GENETICIN (G418Sulfate, GIBCO) を含有する CHO-S-SFMII 培地 (GIBCO) の選択培地に交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2 週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後に、後述の抗体濃度測定 E L I S A にて抗体産生量を測定し、抗体産生量の多い細胞を選別した。

【0110】

参考例 5. ヒト型化抗体の構築

(1) ヒト型化抗体 H 鎖の構築

(i) ヒト型化 H 鎖バージョン “a” の構築

ヒト型化 A T R-5 抗体 H 鎖を、PCR 法による C D R-グラフティングにより作製した。ヒト抗体 L 3 9 1 3 0 (DDBJ, Gao L. ら、未発表、1995) 由来の F R を有するヒト型化 A T R-5 抗体 H 鎖バージョン “a” の作製のために 7 個の PCR プライマーを使用した。C D R-グラフティングプライマー h R 5 H v 1 S (配列番号 11)、h R 5 H v 2 S (配列番号 12) 及び h R 5 H v 4 S (配列番号 13) はセンス DNA 配列を有し、そして C D R グラフティングプライマー h R 5 H v 3 A (配列番号 14) 及び h R 5 H v 5 A (配列番号 15) はアンチセンス DNA 配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に 18-35 b p の相補的配列を有する。

【0111】

hR5Hv1SはKozakコンセンサス配列(Kozak, M, ら, J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987)及びSalI認識部位を有するように、またhR5Hv5AはNheI認識部位を有するように設計した。また外部プライマーhR5HvPrS(配列番号16)はCDRグラフトイングプライマーhR5Hv1Sと、hR5HvPrA(配列番号17)はCDRグラフトイングプライマーhR5Hv5Aとホモロジーを有する。

CDR-グラフトイングプライマーhR5Hv1S、hR5Hv2S、hR5Hv3A、hR5Hv4S及びhR5Hv5A、ならびに外部プライマーhR5HvPrS及びhR5HvPrAはPharmacia Biotechにより合成及び精製された。

【0112】

PCRは、KOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績)を用い、98 μ l中に120mM Tris-HCl(pH8.0)、10mM KCl、6mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgCl₂、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績)、CDR-グラフトイングプライマーhR5Hv1S、hR5Hv2S、hR5Hv3A、hR5Hv4S及びhR5Hv5Aをそれぞれ5pmoleを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて30秒間、50℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに100pmoleの外部プライマーhR5HvPrS及びhR5HvPrAを加え、100 μ lの系で同じ温度サイクルを25回行った。PCR法により増幅したDNA断片を2%のNuSieve GTGアガロース(FMC Bio.Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

【0113】

約430bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、3倍量(ml/g)のTEを添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出によりDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、その3分の1量を水17 μ lに溶解した。得られたPCR反応混合物

をNhe I及びSal Iで消化し、Nhe I及びSal Iで消化することにより調製したプラスミドベクターCVIDECに、DNAライゲーションキットver. 2 (宝酒造) を用い添付の処方に従って反応させ連結した。

【0114】

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞(ニッポンジーン) 100 μ lに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300 μ lのHi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100 μ g/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地3mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを調製した。

【0115】

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer)により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4(宝酒造)及びM13 Primer RV(宝酒造)を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

【0116】

EcoT22I認識部位の前もしくは後に変異、欠失が認められたため、それぞれ正しい配列を有する断片を連結して再度CVIDECにサブクローニングし、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hva/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hva/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“a”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号18に示す。また、バージョン“a”のアミノ酸配列を配列番号19に示す。

【0117】

(ii) ヒト型化H鎖バージョン“b”及び“c”の構築

バージョン“b”及び“c”をFR-シャッフリング法によってバージョン“a”のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作製した。バージョン“b”ではFR3をヒト抗体Z34963 (DDBJ, Borretzen M.ら, Proc.Natl.Acad.Sci. U.

S.A., 91, 12917-12921, 1994)由来のものに置換するため、FR3をコードするDNAプライマーを4個作製した。FR-シャッフリングプライマーF3RFFS (配列番号20) 及びF3RFBS (配列番号21) はセンスDNA配列を有し、F3RFFA (配列番号22) 及びF3RFBA (配列番号23) はアンチセンスDNA配列を有する。

【0118】

F3RFFSとF3RFFAは互いに相補的な配列を有し、両端にB a l I及びX h o Iの認識配列を有する。バージョン“c”ではFR3をヒト抗体P01825 (SWISS-PROT、Poljak R.J.ら, Biochemistry, 16, 3412-3420, 1977)由来のものに置換するため、FR3をコードするDNAプライマーを4個作製した。FR-シャッフリングベクターF3NMFS (配列番号24) 及びF3NMBS (配列番号25) はセンスDNA配列を有し、F3NMFA (配列番号26) 及びF3NMBA (配列番号27) はアンチセンスDNA配列を有する。F3RFBSとF3RFBAは互いに相補的な配列を有し、両端にX h o I及びN c o Iの認識配列を有する。

【0119】

F3RFFS、F3RFBS、F3RFFA、F3RFBA、F3NMFS、F3NMBS、F3NMFA及びF3NMBAはPharmacia Biotechにより合成された。F3RFFSとF3RFFA、F3RFBSとF3RFBAをアニールさせ、それぞれB a l I及びX h o I、N c o I及びX h o Iで消化した。これらをB a l I及びN c o Iで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hv a/CVIDEC (B a l I/N c o I) に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hv b/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hv b/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“b”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号28に示す。また、バージョン“b”のアミノ酸配列を配列番号29に示す。

【0120】

F3NMFSとF3NMFA、F3NMBSとF3NMBAをアニールさせ、それぞれB a l I及びX h o I、N c o I及びX h o Iで消化した。これらをB

a1I及びNcoIで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hva/CVIDEC (BalI/NcoI)に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvc/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvc/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“c”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号30に示す。また、バージョン“c”のアミノ酸配列を配列番号31に示す。

【0121】

(iii) ヒト型化H鎖バージョン“d”及び“e”の構築
バージョン“d”及び“e”をFR-シャッフリング法によってバージョン“a”のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作製した。バージョン“d”ではFR3をヒト抗体M62723 (DDBJ, Pascual V.ら, J.Clin.Invest., 86, 1320-1328, 1990)由来のものに置換するため、FR3をコードするDNAプライマーを4個作製した。FR-シャッフリングプライマーF3EPS (配列番号32) はセンスDNA配列を有し、F3EPA (配列番号33) はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。

【0122】

また外部プライマーF3PrS (配列番号34) 及びF3PrA (配列番号35) はFR-シャッフリングプライマーF3EPS及びF3EPAとホモロジーを有し、他のFR3のシャッフリングにも用いることができる。バージョン“e”ではFR3をヒト抗体Z80844 (DDBJ, Thomsett AR.ら, unpublished)由来のものに置換するため、FR3をコードするDNAプライマーを2個作製した。FR-シャッフリングプライマーF3VHS (配列番号36) はセンスDNA配列を有し、F3VHA (配列番号37) はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。F3EPS、F3EPA、F3PrS、F3PrA、F3VHS及びF3VHAは Pharmacia Biotechにより合成された。

【0123】

PCRは、KOD DNA Polymerase (東洋紡績) を用い、100 μ lの反応混合液に1 μ MのFR-シャッフリングプライマーF3EPSとF3EPA、又はF3

VHSとF3VHAをそれぞれ5 μ l、0.2 mMのdNTPs、1.0 mMのMgCl₂、2.5 UのKOD DNAポリメラーゼを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて30秒間、50℃にて1分間、74℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに100 pmoleの外部プライマーF3PrS及びF3PrAを加え、同じ温度サイクルを25回行った。

【0124】

PCR法により増幅したDNA断片を2%のNuSieve GTGアガロース(FMC Bio. Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。424 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、3倍量(ml/g)のTEを添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出によりDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、その3分の1量を水14 μ lに溶解した。得られたPCR反応混合物をBamI及びNcoIで消化し、これらをBamI及びNcoIで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hv a/CVIDEC (BamI/NcoI)に導入し、塩基配列を決定した。

【0125】

正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hv d/CVIDEC及びhATR5Hv e/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hv d/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“d”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号38に、バージョン“d”のアミノ酸配列を配列番号39に示す。また、プラスミドhATR5Hv e/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“e”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号40に、バージョン“e”のアミノ酸配列を配列番号41に示す。

【0126】

(iv) ヒト型化H鎖バージョン“f”及び“g”の構築

バージョン“f”及び“g”はFR-シャッフリング法によってバージョン“a”のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作製した。バージョン“f”はヒト抗体L04345 (DDBJ, Hillson JL. ら, J.Exp.Med., 178, 331-336, 1993) 由来のFR3に、バージョン“g”はS78322 (DDBJ, Bejcek BE. ら, Cancer Res

., 55, 2346-2351, 1995) 由来の F R 3 に置換するため F R 3 をコードするプライマーを 2 個ずつ合成した。バージョン “f” の F R - シャッフリングプライマー F 3 S S S (配列番号 4 2) はセンス DNA 配列を有し、F 3 S S A (配列番号 4 3) はアンチセンス DNA 配列を有し、プライマーの 3' - 末端は 1 8 b p の相補的配列を有する。

【0 1 2 7】

バージョン “g” の F R - シャッフリングプライマー F 3 C D S (配列番号 4 4) はセンス DNA 配列を有し、F 3 C D A (配列番号 4 5) はアンチセンス DNA 配列を有し、プライマーの 3' - 末端は 1 8 b p の相補的配列を有する。F 3 S S S、F 3 S S A、F 3 C D S 及び F 3 C D A は Pharmacia Biotech により合成及び精製された。PCR は、K O D DNA ポリメラーゼ (東洋紡績) を用い、1 0 0 μ l の反応混合液に 1 μ M の F R - シャッフリングプライマー F 3 S S S 及び F 3 S S A もしくは F 3 C D S 及び F 3 C D A をそれぞれ 5 μ l ずつ、0. 2 mM の d N T P s、1. 0 mM の M g C l 2、2. 5 U の K O D DNA ポリメラーゼを含む条件で添付緩衝液を使用して 9 4 $^{\circ}$ C にて 3 0 秒間、5 0 $^{\circ}$ C にて 1 分間、7 4 $^{\circ}$ C にて 1 分間の温度サイクルで 5 回行い、さらに 1 0 0 p m o l e の外部プライマー F 3 P r S 及び F 3 P r A を加え、同じ温度サイクルを 2 5 回行った。

【0 1 2 8】

PCR 法により増幅した DNA 断片を 2 % の Nu Sieve GTG アガロース (FMC Bio . Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。4 2 4 b p 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切取り、3 倍量 (m l / g) の T E を添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出により DNA 断片を精製した。精製した DNA をエタノールで沈殿させた後、その 3 分の 1 量を水 1 4 μ l に溶解した。得られた PCR 反応混合物を B a l I 及び N c o I で消化し、これらを B a l I 及び N c o I で消化することにより調製したプラスミド h A T R 5 H v a / C V I D E C (B a l I / N c o I) に導入し、塩基配列を決定した。

【0 1 2 9】

正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvf/CVIDEC及びhATR5Hvg/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvf/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“f”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“f”アミノ酸配列を配列番号46及び47に示す。また、プラスミドhATR5Hvg/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“g”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“g”のアミノ酸配列を配列番号48及び49に示す。

【0130】

(v) ヒト型化H鎖バージョン“h”の構築

バージョン“h”はFR-シャッフリング法によってバージョン“a”のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作製した。バージョン“h”はヒト抗体Z26827 (DDBJ、Van Der Stoep ら, J.Exp.Med., 177, 99-107, 1993)由来のFR3に置換するためFR3をコードするプライマーを2個ずつ合成した。バージョン“h”のFR-シャッフリングプライマーF3ADS (配列番号50)はセンスDNA配列を有し、F3ADA (配列番号51)はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。

【0131】

F3ADS及びF3ADAはPharmacia Biotechにより合成及び精製された。PCRは、KOD DNAポリメラーゼ (東洋紡績) を使い、100 μ lの反応混合液に1 μ MのFR-シャッフリングプライマーF3ADS及びF3ADAをそれぞれ5 μ lずつ、0.2mMのdNTPs、1.0mMのMgCl₂、2.5UのKOD DNAポリメラーゼを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて30秒間、50℃にて1分間、74℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに100pmoleの外部プライマーF3PrS及びF3PrAを加え、同じ温度サイクルを25回行った。PCR法により増幅したDNA断片を2%のNuSieve GTGアガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

【0132】

424bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、3倍量 (ml/

g) のTEを添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出によりDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、その3分の1量を水14 μ lに溶解した。得られたPCR反応混合物をB a l I及びN c o Iで消化し、これらをB a l I及びN c o Iで消化することにより調製したプラスミドh A T R 5 H v a / C V I D E C (B a l I / N c o I)に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをh A T R 5 H v h / C V I D E Cと命名した。プラスミドh A T R 5 H v h / C V I D E Cに含まれるヒト型化H鎖バージョン“h”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号52に示す。また、バージョン“h”のアミノ酸配列を配列番号53に示す。

【0133】

(v i) ヒト型化H鎖バージョン“i”及び“j”の構築

バージョン“i”及び“j”はFR-シャッフリング法によってバージョン“a”のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作製した。バージョン“i”はヒト抗体U95239 (DDBJ, Manheimer-Lory AJ., unpublished)由来のFR3に、バージョン“j”はL03147 (DDBJ, Collet TA.ら, Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 89, 10026-10030, 1992)由来のFR3に置換するためFR3をコードするプライマーを2個ずつ合成した。バージョン“i”のFR-シャッフリングプライマーF3MMS (配列番号54)はセンスDNA配列を有し、F3MMA (配列番号55)はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。

【0134】

バージョン“j”のFR-シャッフリングプライマーF3BMS (配列番号56)はセンスDNA配列を有し、F3BMA (配列番号57)はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。F3MMS、F3MMA、F3BMS及びF3BMAはPharmacia Biotechにより合成及び精製された。PCRは、Ampli Taq Gold (Perkin-Elmer)を用い、100 μ lの反応混合液に1 μ MのFR-シャッフリングプライマーF3MMSとF3MMA、又はF3BMSとF3BMAをそれぞれ5 μ lずつ、0.2mMのd

NTPs、1.5 mMのMgCl₂、2.5 UのAmpli Taq Goldを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて30秒間、50℃にて1分間、74℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに100 pmoleの外部プライマーF3PrS及びF3PrAを加え、同じ温度サイクルを25回行った。

【0135】

PCR法により増幅したDNA断片を2%のNu Sieve GTGアガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。424 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、3倍量 (ml/g) のTEを添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出によりDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、その3分の1量を水14 µlに溶解した。得られたPCR反応混合物をBamHI及びNcoIで消化し、これらをBamHI及びNcoIで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hv a/CVIDEC (BamHI/NcoI) に導入し、塩基配列を決定した。

【0136】

正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hv i/CVIDEC及びhATR5Hv j/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hv i/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“i”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“i”アミノ酸配列を配列番号58及び59に示す。また、プラスミドhATR5Hv j/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“j”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“j”のアミノ酸配列を配列番号60及び61に示す。

【0137】

(vii) ヒト型化H鎖バージョン“b1”及び“d1”の構築

バージョン“b1”及び“d1”はFR-シャッフリング法によってバージョン“b”及び“d”のFR2を別のヒト抗体由来のFR2に置換し作製した。ヒト抗体P01742 (SWISS-PROT, Cunningham BA.ら, Biochemistry, 9, 3161-3170, 1970) 由来のものに置換するため、FR2をコードするDNAプライマーを2個作製した。FR-シャッフリングベクターF2MPS (配列番号62) はセンス

DNA配列を有し、F2MPA（配列番号63）はアンチセンスDNA配列を有する。また、互いに相補的な配列を有し、両端にはEcoT22I及びBaliの認識配列を有する。

【0138】

F2MPS、F2MPAはPharmacia Biotechにより合成及び精製された。F2MPSとF2MPAをアニールさせ、EcoT22I及びBaliで消化した。これをEcoT22I及びBaliで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hvb/CVIDEC（EcoT22I/Bali）及びhATR5Hvd/CVIDEC（EcoT22I/Bali）に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvb1/CVIDEC及びhATR5Hvd1/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvb1/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“b1”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“b1”アミノ酸配列を配列番号64及び65に示す。また、プラスミドhATR5Hvd1/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“d1”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“d1”のアミノ酸配列を配列番号66及び67に示す。

【0139】

（viii）ヒト型化H鎖バージョン“b3”及び“d3”の構築

バージョン“b3”及び“d3”はFR-シャッフリング法によってバージョン“b”及び“d”のFR2を別のヒト抗体由来のFR2に置換し作製した。ヒト抗体Z80844（DDBJ、Thomsett AR.ら、unpublished）由来のFR2に置換するため、FR2をコードするDNAプライマーを2個作製した。FR-シャッフリングベクターF2VHS（配列番号68）はセンスDNA配列を有し、F2VHA（配列番号69）はアンチセンスDNA配列を有する。また、互いに相補的な配列を有し、両端にはEcoT22I及びBaliの認識配列を有する。F2VHS、F2VHAはPharmacia Biotechに合成、精製を委託した。

【0140】

F2VHSとF2VHAをアニールさせ、EcoT22I及びBaliで消化した。これをEcoT22I及びBaliで消化することにより調製したプラス

ミドhATR5Hvb/CVIDEC (EcoT22I/BalI) 及びhATR5Hvd/CVIDEC (EcoT22I/BalI) に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvb3/CVIDEC 及びhATR5Hvd3/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvb3/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“b3”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“b3”アミノ酸配列を配列番号70及び71に示す。また、プラスミドhATR5Hvd3/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“d3”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“d3”のアミノ酸配列を配列番号72及び73に示す。

【0141】

(2) ヒト型化抗体L鎖V領域の構築

(i) バージョン“a”

ヒト型化ATR5抗体L鎖を、PCR法によるCDR-グラフティングにより作製した。ヒト抗体Z37332 (DDBJ, Welschof Mら, J.Immunol.Methods, 179, 203-214, 1995)由来のフレームワーク領域を有するヒト型化抗体L鎖(バージョン“a”)の作製のために7本のPCRプライマーを使用した。

【0142】

CDR-グラフティングプライマーh5Lv1S (配列番号74) 及びh5Lv4S (配列番号75) はセンスDNA配列を、CDRグラフティングプライマーh5Lv2A (配列番号76)、h5Lv3A (配列番号77) 及びh5Lv5A (配列番号78) はアンチセンスDNA配列を有し、各プライマーの両端に20bpの相補的配列を有する。外部プライマーh5LvS (配列番号79) 及びh5LvA (配列番号80) はCDRグラフティングプライマーh5Lv1S 及びh5Lv5Aとホモロジーを有する。CDR-グラフティングプライマーh5Lv1S、h5Lv4S、h5Lv2A、h5Lv3A、h5Lv5A、h5LvS及びh5LvAはPharmacia Biotechに合成、精製を委託した。

【0143】

PCR溶液は、100 μ l中に120mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM KCl、6mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Triton

X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM $MgCl_2$ 、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績)、5 pmoleのCDRグラフトイングプライマーh5Lv1S、h5Lv2A、h5Lv3A、h5Lv4S、及びh5Lv5Aを含有する。

【0144】

PCRはDNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer) を使い、94℃にて30秒間、50℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルを5回行うことにより、5本のCDRグラフトイングプライマーをアセンブルした。この反応混合液に100 pmoleの外部プライマーh5LvS及びh5LvAを加え、94℃にて30秒間、52℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルを30回行うことにより、アセンブルしたDNA断片を増幅した。

【0145】

PCR反応混合液を3% NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約400 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノール沈殿により回収した。回収したDNA断片を制限酵素Spl I (宝酒造) 及びBgl II (宝酒造) により37℃で4時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TE 10 μ lに溶解した。上記のようにして調製したヒト型化抗体L鎖V領域をコードする遺伝子を含むSpl I-Bgl II DNA断片とSpl I及びBgl IIで消化することにより調製したCVIDECベクターをDNAライゲーションキットver. 2 (宝酒造) を使い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

【0146】

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞(ニッポンジーン) 100 μ lに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300 μ lのHi-Competence Broth(ニッポンジーン) を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100 μ g/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃に

て一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を L B A 培地 3 m l で 3 7 ° C にて一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を調製した。

【0 1 4 7】

プラスミド中の c D N A コード領域の塩基配列を Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとして M 1 3 P r i m e r M 4 (宝酒造) 及び M 1 3 P r i m e r R V (宝酒造) を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。このヒト型化抗体 L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含み、5' - 側に B g l I I 認識配列及び K o z a k 配列、3' - 側に S p l I 認識配列を持つプラスミドを h A T R 5 L v a / C V I D E C と命名した。ヒト型化 L 鎖バージョン " a " の塩基配列 (対応するアミノ酸を含む) を配列番号 8 1 に示す。また、バージョン " a " のアミノ酸配列を配列番号 8 2 に示す。

【0 1 4 8】

(i i) バージョン " b " 及び " c "

バージョン " b " 及び " c " を、バージョン " a " の F R 3 を置換 (F R - シヤッフリング) することにより作製した。バージョン " b " にはヒト抗体 S68699 (DDBJ, Houghs L ら, Exp.Clin.Immunogen et., 10, 141-151, 1993) 由来の F R 3 を、バージョン " c " にはヒト抗体 P01607 (SWISS-PROT, Epp O ら, Biochemistry, 14, 4943-4952, 1975) 由来の F R 3 をそれぞれ使用した。

【0 1 4 9】

バージョン " b " の F R 3 をコードするプライマー F 3 S S (配列番号 8 3) と F 3 S A (配列番号 8 4)、あるいはバージョン " c " の F R 3 をコードするプライマー F 3 R S (配列番号 8 5) と F 3 R A (配列番号 8 6) は互いに相補的な配列を有し、両端に制限酵素 K p n I 及び P s t I の認識配列を有する。F 3 S S、F 3 S A、F 3 R S、F 3 R A は Pharmacia Biotech に合成、精製を委託した。各 1 0 0 p m o l e の F 3 S S と F 3 S A、あるいは F 3 R S と F 3 R A を 9 6 ° C にて 2 分間、5 0 ° C にて 2 分間処理することによりアニーリングさせ

、2本鎖DNA断片を作製した。

【0150】

これら2本鎖DNA断片を制限酵素KpnI（宝酒造）により37℃で1時間消化し、次いで制限酵素PstI（宝酒造）により37℃で1時間消化した。消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

プラスミドhATR5Lv a/CVIDECを制限酵素KpnI（宝酒造）により37℃で1時間消化し、次いで制限酵素PstI（宝酒造）により37℃で1時間消化した。消化混合物を1.5% NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約3000bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

【0151】

上記のようにして調製したバージョン“b”あるいは“c”のFR3をコードするKpnI-PstI DNA断片とKpnI及びPstIで消化することによりFR3を除去したhATR5Lv a/CVIDECベクターをDNAライゲーションキットver. 2（宝酒造）を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

【0152】

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞（ニッポンジーン）100μlに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300μlのHi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100μg/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地3mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを調製した。

【0153】

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A (Pe

rk-in-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4(宝酒造) 及びM13 Primer RV(宝酒造) を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

【0154】

これらヒト型化抗体L鎖バージョン“a”のFR3を置換したバージョン“b”あるいはバージョン“c”をコードする遺伝子を含有するプラスミドをそれぞれhATR5Lv b/CVIDEC、hATR5Lv c/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Lv b/CVIDECに含まれるヒト型化L鎖バージョン“b”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“b”アミノ酸配列を配列番号87および88に示す。また、プラスミドhATR5Lv c/CVIDECに含まれるヒト型化L鎖バージョン“c”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列およびバージョン“c”のアミノ酸配列を配列番号89および90に示す。

【0155】

(iii) バージョン“b1”及び“b2”

バージョン“b1”及び“b2”を、バージョン“b”のFR2を置換することにより作製した。バージョン“b1”にはヒト抗体S65921 (DDBJ, Tonge DWら, Year Immunol., 7, 56-62, 1993)由来のFR2を、バージョン“b2”にはヒト抗体X93625 (DDBJ, Cox JPら, Eur.J.Immunol., 24, 827-836, 1994)由来のFR2をそれぞれ使用した。

【0156】

バージョン“b1”のFR2をコードするプライマーF2SS (配列番号91) とF2SA (配列番号92)、あるいはバージョン“b2”のFR2をコードするプライマーF2XS (配列番号93) とF2XA (配列番号94) は互いに相補的な配列を有し、両端に制限酵素AflII及びSpeIの認識配列を有する。F2SS、F2SA、F2XS及びF2XAは Pharmacia Biotechにより合成された。各100 pmoleのF2SSとF2SA、あるいはF2XSとF2XAを96℃にて2分間、50℃にて2分間処理することによりアニーリングさせ、2本鎖DNA断片を作製した。

【0157】

これら2本鎖DNA断片を制限酵素AflII（宝酒造）及びSpeI（宝酒造）により37℃で1時間消化した。消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

プラスミドhATR5Lv b/CVIDECを制限酵素AflII（宝酒造）及びSpeI（宝酒造）により37℃で1時間消化した。消化混合物を1.5% NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約3000bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

【0158】

上記のようにして調製したバージョン“b1”あるいは“b2”のFR2をコードするAflII-SpeI DNA断片とAflII及びSpeIで消化することによりFR2を除去したhATR5Lv b/CVIDECベクターをDNAライゲーションキットver. 2（宝酒造）を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

【0159】

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞（ニッポンジーン）100μlに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300μlのHi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100μg/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地4mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを調製した。

【0160】

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer)により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4(宝酒造)及びM13 Primer RV(宝酒造)を用い、両方向の塩基配列を確認することによ

り配列を決定した。

【0161】

これらヒト型化抗体L鎖バージョン“b”のFR2を置換したバージョン“b1”あるいはバージョン“b2”をコードする遺伝子を含有するプラスミドをそれぞれhATR5Lv b1/CVIDEC及びhATR5Lv b2/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Lv b1/CVIDECに含まれるヒト型化L鎖バージョン“b1”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列及びバージョン“b1”アミノ酸配列を配列番号95及び96に示す。また、プラスミドhATR5Lv b2/CVIDECに含まれるヒト型化L鎖バージョン“b2”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列及びバージョン“b2”のアミノ酸配列を配列番号97及び98に示す。

【0162】

(3) ヒト型化抗体の発現ベクターの構築

(i) ヒト型化H鎖とキメラL鎖との組合せ

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv a/CVIDECをNhe I及びSal Iで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、chATR-5抗体発現プラスミドベクター、chATR5/N5KG4PをNhe I及びSal Iにて消化することにより調製したchATR5/N5KG4P(Sal I/Nhe I)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHv a-chLv/N5KG4Pと命名した。

【0163】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv b/CVIDECをNhe I及びSal Iで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、chATR-5抗体発現プラスミドベクター、chATR5/N5KG4PをNhe I及びSal Iにて消化することにより調製したchATR5/N5KG4P(Sal I/Nhe I)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHv b-chLv/N5KG4Pと命名した。

【0164】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv c/CVIDEC、hATR5H

v d / C V I D E C 及び h A T R 5 H v e / C V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、chATR-5抗体発現プラスミドベクター、chATR5 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製したchATR5 / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHv c - c h L v / N 5 K G 4 P、hHv d - c h L v / N 5 K G 4 P 及び h H v e - c h L v / N 5 K G 4 P と命名した。

【0165】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv f / C V I D E C 及びhATR5Hv h / C V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、chATR-5抗体発現プラスミドベクター、chATR5 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製したchATR5 / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHv f - c h L v / N 5 K G 4 P 及び h H v h - c h L v / N 5 K G 4 P と命名した。

【0166】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv i / C V I D E C 及びhATR5Hv j / C V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、chATR-5抗体発現プラスミドベクター、chATR5 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製したchATR5 / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHv i - c h L v / N 5 K G 4 P 及び h H v j - c h L v / N 5 K G 4 P と命名した。

【0167】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv b 1 / C V I D E C 及びhATR5Hv d 1 / C V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、chATR-5抗体発現プラスミドベクター、chATR5 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製したchATR5 / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作

製したプラスミドを $hHv b 1 - chLv / N5KG4P$ 及び $hHv d 1 - chLv / N5KG4P$ と命名した。

【0168】

(ii) ヒト型化L鎖とキメラH鎖との組み合わせ

抗体発現ベクター $N5KG4P$ を用いて、キメラH鎖との組み合わせでヒト型化抗体を発現させることにより、ヒト型化L鎖の評価を行った。

プラスミド $hATR5Lv a / CVIDE C$ 、 $hATR5Lv b / CVIDE C$ 、 $hATR5Lv c / CVIDE C$ 、 $hATR5Lv b 1 / CVIDE C$ 、 $hATR5Lv b 2 / CVIDE C$ を制限酵素 $Bgl II$ (宝酒造) 及び $Spl I$ (宝酒造) により $37^{\circ}C$ で 2~3 時間消化した。消化混合物を 1.5% または 2%

$NuSieve GTG$ アガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約 400 bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA 断片をエタノールで沈殿させた後、TE に溶解した。

【0169】

これら各バージョンのヒト型化L鎖V領域をコードする遺伝子を含む $Spl I - Bgl II$ DNA 断片と $Spl I$ 及び $Bgl II$ で消化した $chATR5Hv / N5KG4P$ を DNA ライゲーションキット $ver. 2$ (宝酒造) を用い、添付の処方に従い $16^{\circ}C$ で 1 時間反応させ連結した。

連結混合物を大腸菌 JM109 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) $100 \mu l$ に加え、氷上で 30 分間、 $42^{\circ}C$ にて 1 分間静置した。次いで $300 \mu l$ の Hi -Competence Broth (ニッポンジーン) を加え $37^{\circ}C$ にて 1 時間インキュベートした後、 $100 \mu g / ml$ LBA 寒天培地上にこの大腸菌をまき、 $37^{\circ}C$ にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

【0170】

この形質転換体を LBA 培地 $250 ml$ または $500 ml$ で $37^{\circ}C$ にて一夜培養し、菌体画分から Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を調製した。これらキメラH鎖とヒト型化L鎖をコードする遺伝子を導入したプラスミドをそれぞれ $chHv - hLv a / N5KG4P$ 、 $chHv - hLv b / N5$

KG4P、chHv-hLv c/N5KG4P、chHv-hLv b1/N5KG4P及びchHv-hLv b2/N5KG4Pと命名した。

【0171】

(iii) ヒト型化H鎖とヒト型化L鎖の組合せ

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv a/CVIDECをNhe I及びSal Iで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“a”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLv a/N5KG4PをNhe I及びSal Iにて消化することにより調製したhLv a/N5KG4P (Sal I/Nhe I) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHv a-hLv a/N5KG4Pと命名した。

【0172】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv b/CVIDEC及びhATR5Hv c/CVIDECをNhe I及びSal Iで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“a”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLv a/N5KG4PをNhe I及びSal Iにて消化することにより調製したhLv a/N5KG4P (Sal I/Nhe I) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHv b-hLv a/N5KG4P及びhHv c-hLv a/N5KG4Pと命名した。

【0173】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv b/CVIDEC、hATR5Hv d/CVIDEC及びhATR5Hv e/CVIDECをNhe I及びSal Iで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLv b/N5KG4PをNhe I及びSal Iにて消化することにより調製したhLv b/N5KG4P (Sal I/Nhe I) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHv b-hLv b/N5KG4P、hHv d-hLv b/N5KG4P及びhHv e-hLv b/N5KG4Pと命名した。

【0174】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv f/CVIDEC、hATR5H

v g / C V I D E C 及び h A T R 5 H v h / C V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化A T R - 5 抗体L鎖バージョン“b”cDNAの配列を含むプラスミドc h H v - h L v b / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製したh L v b / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドをh H v f - h L v b / N 5 K G 4 P 、 h H v g - h L v b / N 5 K G 4 P 及びh H v h - h L v b / N 5 K G 4 P と命名した。

【0175】

H鎖V領域を含むプラスミドh A T R 5 H v i / C V I D E C 及びh A T R 5 H v j / C V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化A T R - 5 抗体L鎖バージョン“b”cDNAの配列を含むプラスミドc h H v - h L v b / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製したh L v b / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドをh H v i - h L v b / N 5 K G 4 P 及びh H v j - h L v b / N 5 K G 4 P と命名した。

【0176】

H鎖V領域を含むプラスミドh A T R 5 H v b 1 / C V I D E C 及びh A T R 5 H v d 1 / C V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化A T R - 5 抗体L鎖バージョン“b”cDNAの配列を含むプラスミドc h H v - h L v b / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製したh L v b / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドをh H v b 1 - h L v b / N 5 K G 4 P 及びh H v d 1 - h L v b / N 5 K G 4 P と命名した。

【0177】

H鎖V領域を含むプラスミドh A T R 5 H v b 3 / C V I D E C 及びh A T R 5 H v d 3 / C V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化A T R - 5 抗体L鎖バージョン“b”cDNAの配列を含むプラスミドc h H v - h L v b / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製したh L v b / N 5 K G 4 P (S a l I /

Nhe I) に導入した。こうして作製したプラスミドを hHv b3-hLv b / N5KG4P 及び hHv d3-hLv b / N5KG4P と命名した。

【0178】

H鎖V領域を含むプラスミド hATR5Hv b / CVIDEC を Nhe I 及び Sal I で消化し、ヒト型化H鎖V領域の cDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b1”及び“b2” cDNAの配列を含むプラスミド chHv-hLv b1 / N5KG4P 及び chHv-hLv b2 / N5KG4P を Nhe I 及び Sal I にて消化することにより調製した hLv b1 / N5KG4P (Sal I / Nhe I) 及び hLv b2 / N5KG4P (Sal I / Nhe I) に導入した。こうして作製したプラスミドを hHv b-hLv b1 / N5KG4P 及び hHv b-hLv b2 / N5KG4P と命名した。

【0179】

H鎖V領域を含むプラスミド hATR5Hv i / CVIDEC を Nhe I 及び Sal I で消化し、ヒト型化H鎖V領域の cDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b1”及び“b2” cDNAの配列を含むプラスミド chHv-hLv b1 / N5KG4P 及び chHv-hLv b2 / N5KG4P を Nhe I 及び Sal I にて消化することにより調製した hLv b1 / N5KG4P (Sal I / Nhe I) 及び hLv b2 / N5KG4P (Sal I / Nhe I) に導入した。こうして作製したプラスミドを hHv i-hLv b1 / N5KG4P 及び hHv i-hLv b2 / N5KG4P と命名した。

【0180】

(4) COS-7細胞へのトランスフェクション

ヒト型化抗体の抗原結合活性及び中和活性を評価するため、前記発現プラスミドをCOS-7細胞で一過性に発現させた。

構築した発現プラスミドベクターをGene Pulser装置(Bio-Rad)を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に形質導入した。PBS中に 1×10^7 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCOS-7細胞0.78mlに、プラスミド50 μ gあるいは20 μ gを加え、1,500V, 25 μ Fの静電容量にてパルスを与えた。

【0181】

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を5%のUltra Low IgGウシ胎児血清(GIBCO)を含有するDMEM培地(GIBCO)に懸濁し、10cm培養皿あるいは15cm培養皿を用いてCO₂ インキュベーターにて培養した。24時間の培養の後、培養上清を吸引除去し、新たに無血清培地HBCHO(アーバインサイエンティフィック)を加えた。さらに72時間もしくは96時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去した。

【0182】

(5) 抗体の精製

COS-7細胞の培養上清からの抗体の精製をAffiGel Protein A MAPSIIキット(Bio-Rad)、あるいはrProtein A Sepharose Fast Flow(Pharmacia Biotech)を用いて行った。AffiGel Protein A MAPSIIキットを用いた精製はキット添付の処方に従って行った。rProtein A Sepharose Fast Flowを用いた精製は以下のように行った。

【0183】

1mlのrProtein A Sepharose Fast Flowをカラムに充填し、10倍量のTBSを流すことによってカラムを平衡化した。平衡化したカラムにCOS-7細胞の培養上清をアプライした後、10倍量のTBSによってカラムを洗浄した。次に13.5mlの2.5mM HCl (pH 3.0)を流すことによって吸着した抗体画分をカラムより溶出した。1.5mlの1M Tris-HCl (pH 8.0)を加えることによって溶出液を中和した。

精製された抗体画分について、セントリプレップ30もしくは100(amicon)を用いた限外濾過を2~3回行うことにより、TBSに溶媒を置換し、最終的に約1.5mlまで濃縮した。

【0184】

参考例 6. 抗体の定量及び活性評価

(1) ELISAによる抗体濃度の測定

抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調製した。ELI

SA用96穴プレート (Maxisorp, NUNC) の各穴を固相化バッファー (0.1M NaHCO_3 、0.02% NaN_3 、pH9.6) (以下、CBと称す) で $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG γ 抗体 (BioSource) $100\mu\text{l}$ で固相化し、 $200\mu\text{l}$ の希釈バッファー (50mM Tris-HCl、1mM MgCl_2 、0.1M NaCl、0.05% Tween20、0.02% NaN_3 、1% ウシ血清アルブミン (BSA)、pH8.1) (以下DBと称す) でブロッキングの後、抗体を発現させたCOS-7細胞の培養上清あるいは精製抗体をDBにて段階希釈して各穴に加えた。

【0185】

1時間室温にてインキュベートし0.05% Tween20を含むダルベッコPBS (以下RBと称す) で洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG γ 抗体 (BioSource) $100\mu\text{l}$ を加えた。1時間室温にてインキュベートしRBで洗浄の後、 $1\text{mg}/\text{ml}$ となるようにSigma104 (p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA) を基質バッファー (50mM NaHCO_3 、10mM MgCl_2 、pH9.8) に溶解したもの (以下、基質溶液と称す) を加え、405/655nmでの吸光度をmicroplate reader (Bio Rad) で測定した。濃度測定のスタンドアードとしてIgG4 κ (The Binding Site) を用いた。

【0186】

(2) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのCell ELISAプレートは、次のようにして調製した。細胞はヒト膀胱癌細胞J82 (ATCC HTB-1) を用いた。細胞培養用96穴プレートの60穴に 1×10^6 個のJ82細胞を播き込んだ。これをCO₂ インキュベーターで1日培養し (10%の牛胎児血清 (GIBCO) を含むRPMI1640培地)、細胞を接着させた。培養液を捨て、 $300\mu\text{l}$ のPBSで各穴を2回洗浄した。4%のパラホルムアルデヒドを含むPBS (以下、PFA/PBSと称す) を各穴に $100\mu\text{l}$ 加え、氷上で10分間静置し、細胞を固相化した。

【0187】

PFA/PBSを捨て、 $300\mu\text{l}$ のPBSで各穴を2回洗浄後、 $250\mu\text{l}$ のDBでブロッキングした。培養上清あるいは精製抗体をDBにて段階希釈して $100\mu\text{l}$ を各穴に加えた。室温にて2時間インキュベートしRBで洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG γ 抗体(BioSource) $100\mu\text{l}$ を加えた。室温にて1時間インキュベートしRBで洗浄ののち、基質溶液を加え、次に $405/655\text{nm}$ での吸光度をMicroplate Reader (Bio-Rad) で測定した。

【0188】

(3) 中和活性の測定

マウス抗体、キメラ抗体及びヒト型化抗体の中和活性は、ヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S(Behringwerke AG) による Factor Xa産生阻害活性を指標に測定した。すなわち、 1.25mg/ml のThromborel S $10\mu\text{l}$ と適当な濃度に希釈した抗体 $10\mu\text{l}$ に緩衝液(5mM の CaCl_2 、 0.1% のBSAを含むTBS) $60\mu\text{l}$ を加え、96穴プレート中で室温で1時間反応させた。これに $3.245\mu\text{g/ml}$ のヒトファクターX(セルサス・ラボラトリーズ)及び 82.5ng/ml のヒトファクターVIIa(エンザイム・リサーチ)をそれぞれ $10\mu\text{l}$ 加え、さらに室温で1時間反応させた。

【0189】

0.5M のEDTAを $10\mu\text{l}$ 加え、反応を停止させた。これに発色基質溶液を $50\mu\text{l}$ 加え、Microplate Reader(Bio Rad)で $405/655\text{nm}$ の吸光度を測定した。室温で1時間反応させ、再度 $405/655\text{nm}$ の吸光度を測定した。抗体無添加の1時間の吸光度変化を 100% の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性(%)を算出した。

発色基質溶液はテストチーム発色基質S-2222(Chromogenix)を添付文書に従い溶解し、精製水で2倍希釈した後、ポリブレン液(0.6mg/ml ヘキサジメチリンブロマイド、SIGMA)と1:1で混和し調製した。

【0190】

(4) 活性の評価

(i) ヒト型化H鎖バージョン“a”とキメラL鎖との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“a”とキメラL鎖を組み合わせた抗体(a-ch)を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、高濃度側で抗原に対する結合量が低下していた。FXa産生阻害による抗原中和能についても陽性対照のキメラ抗体(ch-ch)に比べて弱い活性であった。よってヒト型化H鎖はFR-シャッフリングによるバージョンアップを行うことにした。なお、ここで用いたキメラ抗体はCOS-7細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

【0191】

(ii) ヒト型化L鎖バージョン“a”とキメラH鎖との組合せ

ヒト型化L鎖バージョン“a”とキメラH鎖を組み合わせた抗体(ch-a)を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、キメラ抗体と同等以上の抗原結合活性が認められた。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて弱い活性であった。よってヒト型化L鎖もFR-シャッフリングによるバージョンアップを行うことにした。なお、ここで用いたキメラ抗体はCOS-7細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

【0192】

(iii) ヒト型化H鎖バージョン“a”とヒト型化L鎖バージョン“a”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“a”とヒト型化L鎖バージョン“a”を組み合わせた抗体(a-a)を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、高濃度側で抗原に対する結合量が低下していた。FXa産生阻害による抗原中和能についても陽性対照のキメラ抗体に比べてかなり弱い活性であった。よってヒト型化H鎖及びL鎖のFR-シャッフリングによるバージョンアップを行うことにした。なお、ここで用いたキメラ抗体はCOS-7細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

【0193】

(iv) ヒト型化H鎖バージョン“b”、“c”及び“d”とキメラL鎖との組合せ

FR-シャッフリングによってバージョンアップしたヒト型化H鎖とキメラL鎖を組み合わせた抗体（それぞれ“b-ch”、“c-ch”、及び“d-ch”）を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、“d-ch”はキメラ抗体と同等の抗原結合活性が認められ、“b-ch”及び“c-ch”はわずかに劣る抗原結合活性を示した。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて、“b-ch”はほぼ同等、“d-ch”はわずかに弱い活性であった。またバージョン“c-ch”はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった。よってヒト型化H鎖バージョン“b”及び“d”がヒト型化H鎖で高い活性を示すと考えられるバージョンであった。

【0194】

(v) ヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン“a”との組合せ

FR-シャッフリングによってバージョンアップしたヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン“a”を組み合わせた抗体（b-a）を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、高濃度で抗原に対する結合量が低下していた。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて、かなり弱い活性であった。よって“b-a”が“a-a”より高い活性を示すバージョンであった。なお、ここで用いたキメラ抗体はCOS-7細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

【0195】

(vi) ヒト型化L鎖バージョン“b”、“c”とキメラH鎖との組合せ

ヒト型化L鎖バージョン“b”及び“c”をキメラH鎖と組み合わせた抗体（それぞれ、“ch-b”、“ch-c”）を作製したところ、いずれの抗体も抗原結合能、抗原中和能ともにキメラ抗体と同等の活性を示した。よってバージョン“b”及び“c”をヒト型化抗体L鎖の候補とした。マウス抗体由来のアミノ酸残基数が1つ少ないバージョン“b”の方がバージョン“c”より抗原性の点で優れていると考えられる。なお、ここで用いたキメラ抗体はCHO細胞DG44で発現させ精製した抗体を用い評価したもので、これ以降の評価でもこの抗体を陽性対照に用いた。

【0196】

(vii) ヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン“b”及び“c”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“b”をヒト型化L鎖バージョン“b”及び“c”と組み合わせた抗体（それぞれ“b-b”及び“b-c”）を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。いずれの抗体も抗原結合能、抗原中和能ともにキメラ抗体よりわずかに劣る活性を示した。

【0197】

(viii) ヒト型化H鎖バージョン“b”及び“d”とヒト型化L鎖バージョン“b”との組合せ

FR-シャッフリングによってバージョンアップしたヒト型化H鎖とヒト型化L鎖バージョン“b”を組み合わせた抗体（それぞれ“b-b”及び“d-b”）を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、“d-b”はキメラ抗体と同等の抗原結合活性が認められ、“b-b”は高濃度でわずかに劣る抗原結合活性を示した。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて、“b-b”はわずかに弱い活性で、“d-b”はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった。よって“b-b”は抗原活性中和能の高いバージョン、“d-b”は抗原結合能の高いバージョンであることが示された。

【0198】

(ix) ヒト型化H鎖バージョン“e”とキメラL鎖及びヒト型化L鎖バージョン“b”との組合せ

ヒト型化L鎖バージョン“e”をキメラL鎖及びヒト型化バージョン“b”と組み合わせた抗体（それぞれ“e-ch”及び“e-b”）を作製したところ、“e-ch”の抗原結合能はキメラ抗体と同等の活性を示したが、“e-b”は抗体の発現量が非常に低く、且つ抗原結合能も殆ど喪失していた。また“e-ch”の抗原活性中和能はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった。よってH鎖バージョン“e”はL鎖バージョン“b”との組合せが悪いと考えられた。

【0199】

(x) ヒト型化H鎖バージョン“f”、“g”及び“h”とヒト型化L鎖バー

ジョン “b” との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン “f”、“g” 及び “h” をヒト型化L鎖バージョン “b” と組み合わせた抗体を（それぞれ “f-b”、“g-b” 及び “h-b”）作製したところ、“f-b” 及び “h-b” の抗体は抗体の発現量が非常に低かった。なお、バージョン “f”、“h” についてはキメラL鎖と組み合わせた抗体も作製したが、発現されなかった。“g-b” は低い濃度から飽和状態に達し、キメラ抗体より弱い抗原結合能を示した。“g-b” の抗原中和能は、キメラ抗体に比べかなり弱い活性であった。

【0200】

(xi) ヒト型化H鎖バージョン “b1” 及び “d1” とヒト型化L鎖バージョン “b” との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン “b1” 及び “d1” をヒト型化L鎖バージョン “b” と組み合わせた抗体を（それぞれ “b1-b” 及び “d1-b”）作製したところ、ともに抗体は殆ど発現されなかった。なお、これらについてはキメラL鎖と組み合わせた抗体も作製したが、発現されなかった。

【0201】

(xii) ヒト型化H鎖バージョン “b3” 及び “d3” とヒト型化L鎖バージョン “b” との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン “b3” 及び “d3” をヒト型化L鎖バージョン “b” と組み合わせた抗体を（それぞれ “b3-b” 及び “d3-b”）作製したところ、“d3-b” の抗原結合能はキメラ抗体よりわずかに劣っており、“b3-b” の抗原結合能はさらに劣っていた。“b3-b” の抗原中和能は “b-b” より上回る活性を示したものの、キメラ抗体の活性には及ばず、“d3-b” は “b-b” と同程度の活性にとどまった。

【0202】

(xiii) ヒト型化H鎖バージョン “i” 及び “j” とキメラL鎖及びヒト型化L鎖バージョン “b” との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン “i” 及び “j” をキメラL鎖と組み合わせた抗体（それぞれ “i-ch” 及び “j-ch”）とヒト型化L鎖バージョン “b” と組

み合わせた抗体（それぞれ“i-b”及び“j-b”）を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。抗原結合能はいずれの抗体もキメラ抗体とほぼ同等の活性を示した。“i-ch”にはキメラ抗体の活性を上回る抗原中和能が認められ、“j-ch”の抗原中和能はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった。“i-b”はキメラ抗体と同等の活性が認められ、“j-b”はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった。

【0203】

(xiv) ヒト型化L鎖バージョン“b1”及び“b2”

ヒト型化L鎖バージョン“b1”及び“b2”をキメラH鎖と組み合わせた抗体（それぞれ、“ch-b1”及び“ch-b2”）を作製したところ、いずれの抗体もキメラ抗体と同等の抗原結合能を示した。抗原中和能については、“ch-b1”ではキメラ抗体と同等の活性を示し、“ch-b2”では高濃度側でキメラ抗体を若干上回る活性が認められた。バージョン“b1”及び“b2”ともにヒト型化抗体L鎖の候補になり得るが、より強い活性を有するという点でバージョン“b2”の方が優れている。

【0204】

(xv) ヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン“b2”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“b”をヒト型化L鎖バージョン“b2”と組み合わせた抗体（“b-b2”）を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。抗原結合能はキメラ抗体よりわずかに劣っていた。抗原中和能は“b-b”の活性を上回ったものの、“i-b”の活性には及ばなかった。

【0205】

(xvi) ヒト型化H鎖バージョン“i”とヒト型化L鎖バージョン“b1”又は“b2”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“i”をヒト型化L鎖バージョン“b1”又は“b2”と組み合わせた抗体（それぞれ“i-b1”及び“i-b2”）を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。“i-b2”の抗原結合能はキメラ抗体とほぼ同等で、“i-b1”はわずかに劣る程度であった。また、“i-b1”及

び“i-b2”の抗原中和能はキメラ抗体や“i-b”を上回る活性を示し、“i-b2”>“i-b1”の順に強かった。

【0206】

参考例 7. CHO細胞産生ヒト型化抗体の作製及び活性評価

(1) CHO安定産生細胞株の樹立

ヒト型化抗体(b-b、i-b及びi-b2)の安定産生細胞株を樹立するため、無血清培地に馴化したCHO細胞(DG44)に抗体発現遺伝子ベクターを導入した。

【0207】

プラスミドDNA、hHvb-hLv b/N5KG4P、hHvi-hLv b/N5KG4P及びhHvi-hLv b2/N5KG4Pを制限酵素SspI(宝酒造)で切断して直鎖状にし、フェノール及びクロロフォルム抽出した後、エタノール沈殿により精製した。エレクトロポレーション装置(Gene Pulser; Bio Rad)により、直鎖状にした発現遺伝子ベクターをDG44細胞に導入した。DG44細胞をPBSに 1×10^7 /mlの細胞密度で懸濁し、この懸濁液約0.8mlに前記のDNAを10もしくは50 μ gを加え、1,500V, 25 μ Fの静電容量にてパルスを与えた。

【0208】

室温にて10分間の回復期間の後、ヒポキサンチン-チミジン(GIBCO)(以下、HT)を含有するCHO-S-SFMII培地に処理された細胞を懸濁し、2枚の96穴平底プレート(Falcon)に100 μ l/穴となるように播種し、CO₂インキュベーターにて培養した。培養開始8~9時間後にHT及び1mg/mlのGENETICIN(GIBCO)を含有するCHO-S-SFMII培地を100 μ l/穴加え、500 μ g/mlのGENETICIN選択培地に変換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。3~4日に一度1/2量の培地を新鮮な培地と交換し、選択培地への変換から約2週間経過した時点で、その4~5日後に細胞の順調な増殖が観察された穴の培養上清の一部を回収した。この培養上清中に発現された抗体濃度を前述の抗体濃度測定ELISAにより測定し、抗体産生量の高い細胞を選出した。

【0209】

(2) ヒト型化抗体の大量精製

前記のように選出したヒト型化抗体 (“b-b”、“i-b”及び“i-b2”) 発現 DG44 細胞株を 2 L ローターボトル (CONING) を用い、500 ml / ボトルの CHO-S-SFMII 培地中で数日培養後、培養液を回収して新鮮な CHO-S-SFMII 培地を加え、再び培養した。培養液は遠心分離により細胞破片を除去し、0.22 μ m もしくは 0.45 μ m のフィルターで濾過した。これを繰り返し、それぞれ全量約 2 L の培養上清を得た。得られた培養上清を Protein A アフィニティーカラム (Poros) を接続した ConSep LC100 システム (ミリポア) にて抗体を精製した。

【0210】

(3) ELISA による抗体濃度の測定

抗体濃度測定のための ELISA プレートを次のようにして調製した。ELISA 用 96 穴プレート (Maxisorp, NUNC) の各穴を CB で 1 μ g / ml の濃度に調製したヤギ抗ヒト IgG γ 抗体 (BioSource) 100 μ l で固相化し、200 μ l の DB でブロッキングの後、抗体を発現させた COS 細胞の培養上清あるいは精製抗体を DB にて段階希釈して各穴に加えた。

【0211】

1 時間室温にてインキュベートし RB で洗浄後、DB で 1000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒト IgG γ 抗体 (BioSource) 100 μ l を加えた。1 時間室温にてインキュベートし RB で洗浄の後、基質溶液を 100 μ l 加え、405 / 655 nm での吸光度を microplate reader (Bio Rad) で測定した。濃度測定のスタンダードとして IgG4 κ (The Binding Site) を用いた。

【0212】

(4) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のための Cell ELISA プレートでは、次のようにして調製した。細胞はヒト膀胱癌細胞 J82 (ATCC HTB-1) を用いた。細胞培養用 96 穴プレートに 1×10^6 個の J82 細胞を播き込んだ。これを CO2

インキュベーターで1日培養し(10%の牛胎児血清(GIBCO)を含むRPMI 1640培地)、細胞を接着させた。培養液を捨て、PBSで各穴を2回洗浄した。PFA/PBSを各穴に100 μ l加え、氷上で10分間静置し、細胞を固相化した。

【0213】

PFA/PBSを捨て、300 μ lのPBSで各穴を2回洗浄後、250 μ lのDBでブロッキングした。精製抗体を上測定結果をもとに、DBにて10 μ g/mlより公比2で段階希釈して100 μ lを各穴に加えた。室温にて2時間インキュベートしRBで洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG γ 抗体(BioSource) 100 μ lを加えた。室温にて1時間インキュベートしRBで洗浄のち、基質溶液を100 μ l加え、次に405/655 nmでの吸光度をMicroplate Reader (Bio-Rad) で測定した。

【0214】

(5) TF中和活性(ファクターXa産生阻害活性)の測定

ヒト型化抗体のファクターXa産生阻害活性は、ヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S(Behringwerke AG) による Factor Xa産生阻害活性を指標に測定した。すなわち、5 mg/mlのThromborel S 10 μ lと抗体10 μ lに緩衝液(5 mMのCaCl₂、0.1%のBSAを含むTBS) 60 μ lを加え、96穴プレート中で室温で1時間反応させた。抗体は緩衝液で200 μ g/mlより公比5で段階希釈した。

【0215】

これに3.245 μ g/mlのヒトファクターX(セルサス・ラボラトリーズ)及び82.5 ng/mlのヒトファクターVIIa(エンザイム・リサーチ)をそれぞれ10 μ l加え、さらに室温で45分間反応させた。0.5 MのEDTAを10 μ l加え、反応を停止させた。これに発色基質溶液を50 μ l加え、Microplate Reader (Bio Rad) で405/655 nmの吸光度を測定した。室温で30分間反応させ、再度405/655 nmの吸光度を測定した。抗体無添加の30分間の吸光度変化を100%の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性(%)を算出した。

発色基質溶液はテストチーム発色基質 S-2222 (Chromogenix) を添付文書に従い溶解し、ポリブレン液 (0.6 mg/ml ヘキサジメチリンブロマイド、SIGMA) と 1:1 で混和し調製した。

【0216】

(6) TF 中和活性 (ファクター X 結合阻害活性) の測定

ヒト型化抗体のファクター X 結合阻害活性は、ヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S (Behringwerke AG) を用い、予め TF と Factor VIIa の複合体を形成させ、その複合体の Factor Xa 産生阻害活性を指標にファクター X 結合阻害活性を測定した。すなわち、5 mg/ml の Thromborel S 10 μ l と 82.5 ng/ml のヒト Factor VIIa (エンザイム・リサーチ) 10 μ l に緩衝液 (5 mM の CaCl₂、0.1% の BSA を含む TBS) 60 μ l を加え、96 穴プレート中で室温で予め 1 時間反応させた。

【0217】

これに抗体溶液を 10 μ l 加え、室温で 5 分間反応させた後、3.245 μ g/ml のヒト Factor X (セルサス・ラボラトリーズ) を 10 μ l 加え、さらに室温で 45 分間反応させた。なお抗体は緩衝液で 200 μ g/ml より公比 2 で段階希釈した。0.5 M の EDTA を 10 μ l 加え、反応を停止させた。これに発色基質溶液を 50 μ l 加え、Microplate Reader (Bio Rad) で 405/655 nm の吸光度を測定した。室温で 30 分間反応させ、再度 405/655 nm の吸光度を測定した。抗体無添加の 30 分間の吸光度変化を 100% の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性 (%) を算出した。

発色基質溶液はテストチーム発色基質 S-2222 (Chromogenix) を添付文書に従い溶解し、ポリブレン液 (0.6 mg/ml ヘキサジメチリンブロマイド、SIGMA) と 1:1 で混和し調製した。

【0218】

(7) TF 中和活性 (血漿凝固阻害活性) の測定

ヒト型化抗体の TF 中和活性 (血漿凝固阻害活性) はヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S (Behringwerke AG) を用いたプロトロンビン時間を指標

に測定した。すなわち、サンプルカップにヒト血漿（コスモ・バイオ） $100\mu\text{l}$ を入れ、これに様々な濃度に希釈した抗体を $50\mu\text{l}$ 加え、 37°C で3分間加温した。予め 37°C に加温しておいた $1.25\text{mg}/\text{ml}$ のThromborel Sを $50\mu\text{l}$ 加え、血漿凝固を開始させた。この凝固時間はAmelung CR-Aを接続したAmelung KC-10A（ともにエム・シー・メディカル）にて測定した。

【0219】

抗体は $80\mu\text{g}/\text{ml}$ より公比2で0.1%のBSAを含有するTBS（以下、BSA-TBS）にて段階希釈した。測定した抗体無添加の凝固時間を100%のTF血漿凝固活性とし、Thromborel Sの濃度と凝固時間をプロットした検量線により抗体を添加した際のそれぞれの凝固時間からTF残存活性を算出した。

検量線は様々なThromborel Sの濃度とその凝固時間を測定することにより作成した。適当に希釈したThromborel S、 $50\mu\text{l}$ に $50\mu\text{l}$ のBSA-TBSを加え、 37°C で3分間加温し、予め 37°C に加温しておいたヒト血漿を $100\mu\text{l}$ 加えて凝固を開始させ凝固時間を測定した。Thromborel Sは $6.25\text{mg}/\text{ml}$ より公比2で 25mM の CaCl_2 を含むハンクス緩衝液（GIBCO）にて段階希釈した。横軸にThromborel S濃度、縦軸に凝固時間を両対数グラフにプロットし、これを検量線とした。

【0220】

（8）活性の評価

“b-b”、“i-b”及び“i-b2”のヒト型化抗体すべてはキメラ抗体と同等以上の活性を有していた（図1）。Factor Xa産生阻害活性、Factor X結合阻害活性及び血漿凝固阻害活性においても、ヒト型化抗体“b-b”、“i-b”及び“i-b2”はキメラ抗体と同等以上の活性を有しており、“i-b2” > “i-b” > “b-b”の順に活性が強かった（図2、3及び4）。

【 0 2 2 1 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Prophylactic or therapeutic agent for venous thrombus

<130> 994126

<160> 102

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer MHC-G1

<400> 1

ggatcccggg ccagtggata gacagatg

28

【 0 2 2 2 】

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer MKC

<400> 2

ggatcccggg tggatggtgg gaagatg

27

【 0 2 2 3 】

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> M13 Primer M4

<400> 3

gttttcccag tcacgac

17

【 0 2 2 4 】

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> M13 Primer RV

<400> 4

caggaaacag ctatgac

17

【 0 2 2 5 】

<210> 5

<211> 408

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(408)

<223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of anti-TF mouse monoclonal antibody ATR-5

<400> 5

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtc aat tca gag gtt cag ctg cag cag tct ggg act aac ctt gtg agg	96
Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Asn Leu Val Arg	
1 5 10	
cca ggg gcc tta gtc aag ttg tcc tgc aaa ggt tct ggc ttc aac att	144
Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cac tgg gtg aag cag agg cct gaa cag ggc ctg	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggt cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aag gcc agt ata aca gca gac aca tcc tcc aac	288
Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn	
65 70 75	
aca gcc tac ctg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc	336
Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
tat ttc tgt gct aga gac tcg ggc tat gct atg gac tac tgg ggt caa	384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	
gga acc tca gtc acc gtc tcc tca	408
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	
110 115	

【0 2 2 6】

<210> 6

<211> 381

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of anti-TF mouse monoclonal antibody ATR-5

<400> 6

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48

Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro

-20 -15 -10 -5

ggt atc aga tgt gac atc aag atg acc cag tct cca tcc tct atg tat 96

Gly Ile Arg Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr

1 5 10

gca tcg ctg gga gag aga gtc act atc act tgc aag gcg agt cag gac 144

Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

15 20 25

att aaa agc ttt tta agt tgg tac cag caa aaa cca tgg aaa tct cct 192

Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Lys Ser Pro

30 35 40

aag acc ctg atc tat tat gca aca agc ttg gca gat ggg gtc cca tca 240

Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser

45 50 55 60

aga ttc agt ggc agt gga tct ggg caa gat tat tct cta acc atc aac 288

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn

65

70

75

aac ctg gag tct gac gat aca gca act tat tat tgt cta cag cat ggt 336

Asn Leu Glu Ser Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly

80

85

90

gag agc ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 381

Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

95

100

105

【 0 2 2 7 】

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer ch5HS

<400> 7

gtctgtcgac ccacatgaa atgcagctgg gtcac

35

【 0 2 2 8 】

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer ch5HA

<400> 8

tgttgctagc tgaggagacg gtgactga

28

【 0 2 2 9 】

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer ch5LS

<400> 9

gtctagatct ccaccatgag ggcccctgct cagtt

35

【 0 2 3 0 】

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer ch5LA

<400> 10

tgttcgtagc ttttatttcc agcttggt

28

【 0 2 3 1 】

<210> 11

<211> 104

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hr5Hv1S

<400> 11

ttctgtcgac ccaccatgaa atgcagctgg gtcattcttct tcctgatggc agtggttaca 60

ggggttaact cacaggtgca gctgttgag tctggagctg tgct

104

【 0 2 3 2 】

<210> 12

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv28

<400> 12

acaggtgcag ctgttggagt ctggagctgt gctggcaagg cctgggactt ccgtgaagat 60

ctcctgcaag gcttcggat tcaacattaa agactactat atgcattg 108

【 0 2 3 3 】

<210> 13

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv4S

<400> 13

gaatggccat agtatgtatg acccgaaatt ccagggcagg gccaaactga ctgcagccac 60

atccgccagt attgcctact tggagttctc gagcctgaca aatgagga 108

【 0 2 3 4 】

<210> 14

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv3A

<400> 14

tcatacatatc tatggccatt cgcaggatca ttcccaccaa tccattctag accctgtcca 60

ggcctctgtt ttacccaatg catatagtag tctttaatgt tgaatccgga 110

【 0 2 3 5 】

<210> 15

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv5A

<400> 15

agaagctagc tgaggagacg gtgaccaggg tgccttggcc ccagtagtcc atggcatagc 60

ccgagtctct tgcacagtaa tagaccgcag aatcctcatt tgtcaggctc 110

【 0 2 3 6 】

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer hR5HvPrS

<400> 16

ttctgtcgac ccaccatga 19

【 0 2 3 7 】

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer hR5HvPrA

<400> 17

agaagctagc tgaggagac 19

【 0 2 3 8 】

<210> 18

<211> 415

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(415)

<223> Nucleotide sequence coding for version "a" of humanized H chain V region

<400> 18

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc agg gcc aaa ctg act gca gcc aca tcc gcc agt 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser

65

70

75

att gcc tac ttg gag ttc tcg agc ctg aca aat gag gat tct gcg gtc 336

Ile Ala Tyr Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val

80

85

90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc

415

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

【 0 2 3 9 】

<210> 19

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "a" of humanized H chain V region

<400> 19

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr

65

70

75

80

Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

[0 2 4 0]

<210> 20

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFFS

<400> 20

ttcttgcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggccg agtcacaatc actgcagaca 60

catccacgaa cacagcctac atggagctct cgagtctgag 100

[0 2 4 1]

<210> 21

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFBS

<400> 21

ggagctctcg agtctgagat ctgaggacac agccatttat tactgtgcaa gagactcggg 60

ctatgccatg gttct 75

[0 2 4 2]

<210> 22

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFFA

<400> 22

ctcagactcg agagctccat gtaggctgtg ttcgtggatg tgtctgcagt gattgtgact 60
cggccctgga atttcgggtc atacatacta tggccaagaa 100

【 0 2 4 3 】

<210> 23

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFBA

<400> 23

agaaccatgg catagcccga gtctcttgca cagtaataaa tggctgtgtc ctcagatctc 60
agactcgaga gctcc 75

【 0 2 4 4 】

<210> 24

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3NMFS

<400> 24

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggccg agtcacaatg ctggtagaca 60
catccaagaa ccagttctcc ctgaggctct cgagtgtgac 100

【 0 2 4 5 】

<210> 25

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3NMBS

<400> 25

gaggctctcg agtgtgacag ccgcggacac agccgtatat tactgtgcaa gagactcggg 60
ctatgccatg gttct 75

【 0 2 4 6 】

<210> 26

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3NMFA

<400> 26

gtcacactcg agagcctcag ggagaactgg ttcttggatg tgtctaccag cattgtgact 60
cggccctgga atttcgggtc atacatacta tggccaagaa 100

【 0 2 4 7 】

<210> 27

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3NMBA

<400> 27

agaaccatgg catagcccga gtctcttgca cagtaatata cggctgtgtc cgcggtgtc 60
aactcgaga gcctc 75

【 0 2 4 8 】

<210> 28

<211> 414

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att 336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile

80 85 90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95 100 105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110 115

【 0 2 4 9 】

<210> 29

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b" of humanized H chain V region

<400> 29

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

【 0 2 5 0 】

<210> 30

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "c" of humanized H chain V region

<400> 30

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atg ctg gta gac aca tcc aag aac	288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn	
65 70 75	
cag ttc tcc ctg agg ctc tcg agt gtg aca gcc gcg gac aca gcc gta	336
Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc	414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser	
110 115	

【 0 2 5 1 】

<210> 31

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "c" of humanized H chain V region

<400> 31

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115

【0 2 5 2】

<210> 32

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3EPS

<400> 32

ttcttgcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt actgcggacg 60
 aatccacgag cacagcctac atggagctct cgagtctgag 100

【0 2 5 3】

<210> 33

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3EPA

<400> 33

agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagaaatata cggccgagtc ctcagatctc 60

agactcgaga gctcc 75

【 0 2 5 4 】

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer F3PrS

<400> 34

ttcttggcca tagtatgtat 20

【 0 2 5 5 】

<210> 35

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer F3PrA

<400> 35

agaaccatgg catagccc 18

【 0 2 5 6 】

<210> 36

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3vHS

<400> 36

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtctcgatt accgcggacg 60

agtcaacgaa gatagcctac atggagctca acagtctgag 100

【 0 2 5 7 】

<210> 37

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3vHA

<400> 37

agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagaaataaa cggccgtgtc ctcagatctc 60

agactgttga gctcc 75

【 0 2 5 8 】

<210> 38

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "d" of humanized H chain V region

<400> 38

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc	288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser	
65 70 75	
aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	
tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa	384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc	414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser	
110 115	

【0 2 5 9】

<210> 39

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "d" of humanized H chain

<400> 39

Gln	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Ala	Val	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Thr
1				5						10					15
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Tyr
				20					25					30	
Tyr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40						45		
Gly	Gly	Asn	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	His	Ser	Met	Tyr	Asp	Pro	Lys	Phe
	50					55						60			
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65				70					75				80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Asp	Ser	Gly	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
			100						105					110	
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser									
															115

【 0 2 6 0 】

<210> 40

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "e" of humanized H chain V region

<400> 40

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc tcg att acc gcg gac gag tca acg aag 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys

65

70

75

ata gcc tac atg gag ctc aac agt ctg aga tct gag gac acg gcc gtt 336

Ile Ala Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

80

85

90

tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc

414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

【 0 2 6 1 】

<210> 41

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "e" of humanized H chain V region

<400> 41

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

【 0 2 6 2 】

<210> 42

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3SSS

<400> 42

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt accgcggaca 60
catccacgag cacagcctac atggagctca ggagcctgag 100

【 0 2 6 3 】

<210> 43

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3SSA

<400> 43

agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagtaataca cggccgtgtc gtcagatctc 60
aggctcctga gctcc 75

【 0 2 6 4 】

<210> 44

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3CDS

<400> 44

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcaa agccactctg actgcagacg 60
aatcctccag cacagcctac atgcaactct cgagcctacg 100

【 0 2 6 5 】

<210> 45

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3CDA

<400> 45

agaaccatgg catagcccga gtctcttgca caagaataga ccgcagagtc ctcagatcgt 60
aggctcgaga gttgc 75

【 0 2 6 6 】

<210> 46

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "f" of humanized H chain V region

<400> 46

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15 -10 -5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1 5 10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15 20 25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30 35 40 45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50 55 60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcc acg agc 288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser

65 70 75

aca gcc tac atg gag ctc agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg 336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val

80 85 90

tat tac tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95 100 105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110 115

【0 2 6 7】

<210> 47

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "f" of humanized H chain V region

<400> 47

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

[0 2 6 8]

<210> 48

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "g" of humanized H chain V region

<400> 48

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc aaa gcc act ctg act gca gac gaa tcc tcc agc 288

Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser

65

70

75

aca gcc tac atg caa ctc tcg agc cta cga tct gag gac tct gcg gtc 336

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val

80

85

90

tat tct tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Ser Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc

414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

【 0 2 6 9 】

<210> 49

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "g" of humanized H chain V region

<400> 49

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

【 0 2 7 0 】

<210> 50

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3ADS

<400> 50

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggccg cgtcaccatg tcagccgaca 60

agtcctccag cgccgcctat ttacagtgga ccagccttaa 100

【 0 2 7 1 】

<210> 51

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3ADA

<400> 51

agaaccatgg catagcccga gtctctcgcg cagaaatata tggcggtgtc cgaggcctta 60

aggctggtcc actgt 75

【 0 2 7 2 】

<210> 52

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "h" of humanized H chain

<400> 52

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc cgc gtc acc atg tca gcc gac aag tcc tcc agc 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser

65

70

75

gcc gcc tat tta cag tgg acc agc ctt aag gcc tcg gac acc gcc ata 336

Ala Ala Tyr Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile

80

85

90

tat ttc tgc gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc

414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

【 0 2 7 3 】

<210> 53

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "h" of humanized H chain V region

<400> 53

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

【 0 2 7 4 】

<210> 54

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3MMS

<400> 54

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt accgcggaca 60
catcgacgag cacagtcttc atggaactga gcagcctgag 100

【 0 2 7 5 】

<210> 55

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3MMA

<400> 55

agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagtaataca cggccgtgtc ttcagatctc 60
aggctgctca gttcc 75

【 0 2 7 6 】

<210> 56

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3BMS

<400> 56

ttcttgcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcaccttt accgcggaca 60
catccgcgaa cacagcctac atggagttga ggagcctcag 100

【 0 2 7 7 】

<210> 57

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3BMA

<400> 57

agaaccatgg catagcccga gtctctcgca caataataaa cagccgtgtc tgcagatctg 60
aggctcctca actcc 75

【 0 2 7 8 】

<210> 58

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "i" of humanized H chain V
region

<400> 58

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcg acg agc	288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser	
65 70 75	
aca gtc ttc atg gaa ctg agc agc ctg aga tct gaa gac acg gcc gtg	336
Thr Val Phe Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
tat tac tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc	414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser	
110 115	

【0 2 7 9】

<210> 59

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "i" of humanized H chain V region

<400> 59

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Phe

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

[0 2 8 0]

<210> 60

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "j" of humanized H chain V region

<400> 60

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acc ttt acc gcg gac aca tcc gcg aac 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn

65

70

75

aca gcc tac atg gag ttg agg agc ctc aga tct gca gac acg gct gtt 336

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val

80

85

90

tat tat tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc

414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

[0 2 8 1]

<210> 61

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "j" of humanized H chain V region

<400> 61

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

[0 2 8 2]

<210> 62

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2MPS

<400> 62

ttctatgcat tgggtgcgcc aggcctccagg acagggcctg gaggatgg gaggggaatga 60

tcctgcgaat ggccattct 79

[0 2 8 3]

<210> 63

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2MPA

<400> 63

agaatggcca ttgcaggat cattccctcc catccactcc aggcctgtc ctggagcctg 60

gcgcacccaa tgcatagaa 79

[0 2 8 4]

<210> 64

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b1" of humanized H chain V region

<400> 64

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15 -10 -5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1 5 10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15 20 25

aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cgc cag gct cca gga cag ggc ctg 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30 35 40 45

gag tgg atg gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Met Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50 55 60

ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn

65 70 75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att 336

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile

80 85 90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc

414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

[0 2 8 5]

<210> 65

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b1" of humanized H chain V region

<400> 65

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

[0 2 8 6]

<210> 66

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "d1" of humanized H chain V region

<400> 66

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cgc cag gct cca gga cag ggc ctg 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gag tgg atg gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Met Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser

65

70

75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta 336

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val

80

85

90

tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

[0 2 8 7]

<210> 67

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "d1" of humanized H chain V region

<400> 67

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115

【0 2 8 8】

<210> 68

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2VHS

<400> 68

ttctatgcat tgggtgacgac aggcccttg acaaggcctt gagggaatga 60
tcctgcgaat ggccatctt 79

【0 2 8 9】

<210> 69

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2VHA

<400> 69

aagatggcca ttcgcaggat cattccctcc aatccactca agcccttgct caggggcctg 60

tcgcacccaa tgcatagaa

79

[0 2 9 0]

<210> 70

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b3" of humanized H chain V region

<400> 70

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50 55 60

ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac 288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn

65 70 75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att 336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile

80 85 90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95 100 105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110 115

【0 2 9 1】

<210> 71

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b3" of humanized H chain V region

<400> 71

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

[0 2 9 2]

<210> 72

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "d3" of humanized H chain V region

<400> 72

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc	288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser	
65 70 75	
aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	
tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa	384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc	414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser	
110 115	

【 0 2 9 3 】

<210> 73

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "d3" of humanized H chain V region

<400> 73

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

[0 2 9 4]

<210> 74

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector LvlS

<400> 74

gtctagatct ccaccatgag ggcccctgct cagttttttg ggatcttggt gctctggtt 60

ccagggatcc gatgtgacat ccagatgacc cagtctcc 98

【 0 2 9 5 】

<210> 75

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector h5Lv4S

<400> 75

ttggcagatg gggccccatc aaggttcagt ggctccggat ctggtaccga tttcactctc 60

accatctcga gtctgcaacc tgaagatttt gcaactta 98

【 0 2 9 6 】

<210> 76

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector h5Lv2A

<400> 76

cttaagaagc ttttaatgtc ctgtgaggcc ttgcacgtga tggtgactct gtctcctaca 60

gatgcagaca gggaggatgg agactgggtc atctggat 98

【 0 2 9 7 】

<210> 77

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector h5Lv3A

<400> 77

gatgggaccc catctgccaa actagttgca taatagatca ggagcttagg ggctttccct 60

ggtttctgct gataccaact taagaagctt ttaatgtc

98

【 0 2 9 8 】

<210> 78

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector h5Lv5A

<400> 78

tgttcgtacg ttgatctcc accttggtcc ctccgccgaa cgtgtacggg ctctcaccat 60

gctgcagaca gtagtaagtt gcaaaatctt cagg 94

【 0 2 9 9 】

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer h5LvS

<400> 79

gtctagatct ccaccatgag 20

【 0 3 0 0 】

<210> 80

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer h5LvA

<400> 80

tgttcgtacg ttgatctc

19

【 0 3 0 1 】

<210> 81

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "a" of humanized L chain V region

<400> 81

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca	48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro	
-20 -15 -10 -5	
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct	96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser	
1 5 10	
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac	144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp	
15 20 25	
att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct	192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro	
30 35 40	
aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca	240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser	
45 50 55 60	

agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat ttc act ctc acc atc tcg 288

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65

70

75

agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt ctg cag cat ggt 336

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly

80

85

90

gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381

Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

95

100

105

【 0 3 0 2 】

<210> 82

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "a" of humanized L chain V region

<400> 82

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20

25

30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

【 0 3 0 3 】

<210> 83

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F3SS

<400> 83

gtctgtgtacc gattacactc tcaccatctc gagcctccag cctgaagatt ttgcaactta 60

ctattgtctg cagaaca 77

【 0 3 0 4 】

<210> 84

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F3SA

<400> 84

tgttctgcag acaatagtaa gttgcaaaat cttcaggctg gaggctcgag atggtgagag 60

tgtaatcggc accagac 77

【 0 3 0 5 】

<210> 85

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F3RS

<400> 85

gtctggtacc gattacactc tcaccatctc gagcctccag cctgaagata ttgcaactta 60
ctattgtctg cagaaca 77

【 0 3 0 6 】

<210> 86

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F3RA

<400> 86

tgttctgcag acaatagtaa gttgcaatat cttcaggctg gaggctcgag atggtgagag 60
tgtaatcggc accagac 77

【 0 3 0 7 】

<210> 87

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b" of humanized L chain V region

<400> 87

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca	48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro	
-20 -15 -10 -5	
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct	96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser	
1 5 10	
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac	144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp	
15 20 25	
att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct	192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro	
30 35 40	
aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca	240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser	
45 50 55 60	
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg	288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser	
65 70 75	
agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt	336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly	
80 85 90	
gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa	381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
95 100 105	

【0 3 0 8】

<210> 88

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b" of humanized L chain V region

<400> 88

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20

25

30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

【 0 3 0 9 】

<210> 89

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "c" of humanized L chain V

region

<400> 89

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca	48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro	
-20 -15 -10 -5	
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct	96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser	
1 5 10	
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac	144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp	
15 20 25	
att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct	192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro	
30 35 40	
aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca	240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser	
45 50 55 60	
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg	288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser	
65 70 75	
agc ctc cag cct gaa gat att gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt	336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly	
80 85 90	
gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa	381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
95 100 105	

【 0 3 1 0 】

<210> 90

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "c" of humanized L chain V region

<400> 90

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20

25

30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

[0 3 1 1]

<210> 91

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2SS

<400> 91

gtctcttaag ttggttccag cagaaaccag ggaaatctcc taagaccctg atctactatg 60

caactagtaa ca

72

【 0 3 1 2 】

<210> 92

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2SA

<400> 92

tggttactagt tgcatagtag atcaggggtct taggagattt ccctgggttc tgctggaacc 60

aacttaagag ac 72

【 0 3 1 3 】

<210> 93

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2XS

<400> 93

gtctcttaag ttggtatcag cagaaaccag agaaagcccc taagtcctg atctattatg 60

caactagtaa ca 72

【 0 3 1 4 】

<210> 94

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2XA

<400> 94

tggttactagt tgcataatag atcaggggact taggggcttt ctctgggttc tgctgatacc 60

aacttaagag ac

【0.3 1 5】

<210> 95

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b1" of humanized L chain V region

<400> 95

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48

Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro

-20 -15 -10 -5

ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96

Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac 144

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

15 20 25

att aaa agc ttc tta agt tgg ttc cag cag aaa cca ggg aaa tct cct 192

Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro

30 35 40

aag acc ctg atc tac tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca 240

Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser

45 50 55 60

agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg 288

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75

agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt 336

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly

80 85 90

gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381

Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

95 100 105

【0 3 1 6】

<210> 96

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b1" of humanized L chain V region

<400> 96

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

【 0 3 1 7 】

<210> 97

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b2" of humanized L chain V region

<400> 97

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48

Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro

-20 -15 -10 -5

ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96

Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac 144

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

15 20 25

att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct 192

Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro

30

35

40

aag tcc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca 240

Lys Ser Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser

45

50

55

60

agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg 288

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser

65

70

75

agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt 336

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly

80

85

90

gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381

Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

95

100

105

【0 3 1 8】

<210> 98

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b2" of humanized L chain V region

<400> 98

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20

25

30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35

40

45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

【 0 3 1 9 】

<210> 99

<211> 117

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-5

<400> 99

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Asn Leu Val Arg Pro Gly Ala

5

10

15

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

【 0 3 2 0 】

<210> 100

<211> 107

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-5

<400> 100

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

5

10

15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20

25

30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35

40

45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Asn Leu Glu Ser

65

70

75

80

Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

【 0 3 2 1 】

<210> 101

<211> 780

<212> DNA

<213> Homosapiens

<220>

<223> DNA coding for soluble human TF

<400> 101

atg gag acc cct gcc tgg ccc cgg gtc ccg cgc ccc gag acc gcc gtc 48

Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val

-30

-25

-20

gct cgg acg ctc ctg ctc ggc tgg gtc ttc gcc cag gtg gcc ggc gct 96

Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala

-15

-10

-5

-1

tca ggc act aca aat act gtg gca gca tat aat tta act tgg aaa tca 144

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser

1

5

10

15

act aat ttc aag aca att ttg gag tgg gaa ccc aaa ccc gtc aat caa 192

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln

20

25

30

gtc tac act gtt caa ata agc act aag tca gga gat tgg aaa agc aaa 240

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys

35

40

45

tgc ttt tac aca aca gac aca gag tgt gac ctc acc gac gag att gtg 288

Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val

50

55

60

aag gat gtg aag cag acg tac ttg gca cgg gtc ttc tcc tac ccg gca 366

Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala

65

70

75

80

ggg aat gtg gag agc acc ggt tct gct ggg gag cct ctg tat gag aac	384
Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn	
85 90 95	
tcc cca gag ttc aca cct tac ctg gag aca aac ctc gga cag cca aca	432
Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr	
100 105 110	
att cag agt ttt gaa cag gtg gga aca aaa gtg aat gtg acc gta gaa	480
Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu	
115 120 125	
gat gaa cgg act tta gtc aga agg aac aac act ttc cta agc ctc cgg	528
Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg	
130 135 140	
gat gtt ttt ggc aag gac tta att tat aca ctt tat tat tgg aaa tct	576
Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser	
145 150 155 160	
tca agt tca gga aag aaa aca gcc aaa aca aac act aat gag ttt ttg	624
Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu	
165 170 175	
att gat gtg gat aaa gga gaa aac tac tgt ttc agt gtt caa gca gtg	672
Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val	
180 185 190	
att ccc tcc cga aca gtt aac cgg aag agt aca gac agc ccg gta gag	720
Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu	
195 200 205	
tgt atg ggc cag gag aaa ggg gaa ttc aga gaa gac tac aaa gac gat	768
Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Asp Tyr Lys Asp Asp	
210 215 220	

gac gat aaa taa

780

Asp Asp Lys

225

【 0 3 2 2 】

<210> 102

<211> 259

<212> PRT

<220>

<223> Amino acid sequence of soluble human TF

<400> 102

Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val

-30

-25

-20

Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala

-15

-10

-5

-1

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser

1

5

10

15

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln

20

25

30

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys

35

40

45

Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val

50

55

60

Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala

65

70

75

80

Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn

85

90

95

Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr

100

105

110

Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu

115

120

125

Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg

130

135

140

Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser

145

150

155

160

Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu

165

170

175

Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val

180

185

190

Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu

195

200

205

Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Asp Tyr Lys Asp Asp

210

215

220

Asp Asp Lys

225

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 静脈血栓の予防又は治療剤の提供。

【解決手段】 ヒト組織因子（ヒトTF）に対する抗体を含んで成る、静脈血栓の予防又は治療剤。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000003311]

1. 変更年月日 1990年 9月 5日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都北区浮間5丁目5番1号

氏 名 中外製薬株式会社

1